

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Universitätsklinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Kewitz

HEMMWIRKUNG VON METYRAPON AUF DIE DURCH
HEXOBARBITAL STIMULIERTE MIKROSOMALE
 H_2O_2 -BILDUNG SOWIE AUF DIE SPEKTRALE BINDUNG
VON HEXOBARBITAL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
GABRIELE LASCHINSKI
aus Berlin

1984

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Universitätsklinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Kewitz

Hemmwirkung von Metyrapon auf die durch Hexobarbital
stimulierte mikrosomale H_2O_2 -Bildung sowie auf die
spektrale Bindung von Hexobarbital

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gabriele Laschinski

aus Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ivar Roots

Korreferent: Prof. Dr. W. Christ

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4. Oktober 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	5
1.1. Reaktionsablauf bei der Hydroxy- lierung eines Substrates durch Cytochrom P-450	5
1.2. Über Cytochrom P-450 katalysierte Oxidationen	8
1.3. Bindungsspektren von Cytochrom P-450 und Substrat	10
1.4. Cytochrom-P-450-Isoenzyme	12
1.5. Verwendung von Metyrapon als Hemmstoff der mischfunktionellen Oxidasen	13
1.6. Fragestellung	13
2. METHODEN	15
2.1. Versuchstiere	15
2.2. Bereitung der Mikrosomen	15
2.3. Eiweißbestimmung	16
2.4. Inkubation	16
2.5. H_2O_2 -Bestimmung	18
2.6. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit	18
2.7. Bestimmung von Cytochrom P-450	19
2.8. Messung der Substrat-Bindungsspektren	19
2.9. Statistische Berechnungen	20
3. ERGEBNISSE	21
3.1. Endogene H_2O_2 -Bildung	21
3.2. Substrat-abhängige H_2O_2 -Bildung	26
3.3. Kinetik der durch Metyrapon gehemmten Substrat-induzierten H_2O_2 -Bildung	27
3.4. Bindungsspektren	45
3.5. Wirkung von Metyrapon auf das Hexobarbital- Bindungsspektrum	49

	Seite
4. DISKUSSION	54
4.1. Eignung der angewandten Methoden	54
4.2. Beeinflussung der endogenen H_2O_2 -Bildung durch Metyrapon	56
4.3. Einfluß von Metyrapon auf die substratindu- zierte H_2O_2 -Bildung	59
4.4. Angriffspunkt von Metyrapon	61
4.5. Korrelation zwischen Wasserstoffperoxidbildung und spektralen Veränderungen	63
ZUSAMMENFASSUNG	71
LITERATURVERZEICHNIS	73

1. EINLEITUNG

Cytochrom P-450 ist das Schlüsselenzym im oxidativen Arzneimittelstoffwechsel. Es wirkt an der Verstoffwechselung einer Vielzahl von Medikamenten ebenso mit wie am Metabolismus von Pestiziden, Karzinogenen, Steroiden und auch verschiedenen körpereigenen Stoffen (7, 51, 61, 69, 107). Chemisch handelt es sich um ein Hämoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 50.000. Sein Hauptfunktionsort in der Zelle ist das endoplasmatische Retikulum, in dessen Membransystem es integriert ist (18). Es kommt in verschiedenen Geweben vor, vor allem in der Leber, aber auch Lunge, Niere und Darm enthalten hohe Aktivität. Den Namen verdankt es seiner Eigenschaft, als reduzierter CO-Komplex bei 450 nm ein Absorptionsmaximum zu haben (27). Wie bei allen Hämoproteinen ist in seiner prosthetischen Gruppe ionisiertes Eisen enthalten. Das Eisen kann in zwei- oder dreiwertiger Form vorliegen und vermag sechs Liganden zu binden, von denen vier durch die Hämgruppe geliefert werden. Die Eigenschaften des ganzen Moleküls hängen von den verbleibenden zwei Liganden und ihrem Einfluß, den sie auf das Elektronenfeld des Komplexes ausüben, ab (6).

1.1. Reaktionsablauf bei der Hydroxylierung eines Substrates durch Cytochrom P-450

Cytochrom P-450 ist die terminale Oxidase in einem Enzymsystem, das von Mason als mischfunktionelle Oxidase bezeichnet wurde (11, 16, 17, 68). Weitere Komponenten dieses Systems sind NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, Phosphatidylcholin und Cytochrom b_5 (8, 9, 65, 66, 99). Es verfügt über ein breites Substratspektrum. Gemeinsam ist den meisten von ihm katalysierten Reaktionen die Übertragung von molekularem Sauerstoff. Da dieses Element in der Zelle in einem reaktionsträgen Zustand vorliegt, muß es vorher aktiviert

werden. Es hat sich gezeigt, daß dieser Vorgang am Cytochrom P-450 stattfindet (11, 22). Der genaue Mechanismus sowie die dabei entstehenden Zwischenprodukte sind aber noch nicht im Detail bekannt (4, 5). Ein mögliches Modell stellt Abb. 1 dar.

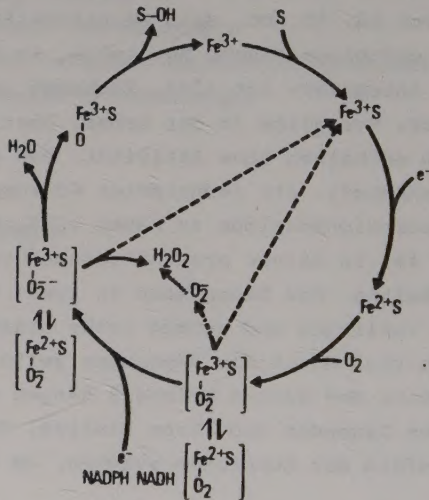


Abb. 1: Modell des Reaktionszyklus von Cytochrom P-450

Es zeigt den Oxidationszustand des Eisens von Cytochrom P-450 im Verlauf der Hydroxylierung eines Substrates S (nach 24).

Nach diesem Schema vollzieht sich die Hydroxylierung eines Substrates in einem Zyklus mit 6 Reaktionsschritten.

- 1) Zu Beginn der Reaktion wird das Substrat an das Apoprotein gebunden, wobei das Häm-Eisen im oxidierten Zu-

stand vorliegt. Dieser Enzym-Substrat-Komplex kann durch typische Bindungsspektren gemessen werden.

- 2) Im nächsten Schritt wird das Eisen im Cytochrom P-450 durch ein Elektron reduziert. Als Elektronenlieferant dient NADPH. Der Transport erfolgt über NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, ein Flavoprotein (89).
- 3) Anschließend reagiert der reduzierte Komplex mit O_2 , das im Gegensatz zum Substrat direkt an das Hämeisen gebunden wird.
- 4) Der so entstandene Oxycytochrom-P-450-Komplex erhält ein weiteres Elektron, das wahrscheinlich über Cytochrom b_5 übertragen wird (3, 19, 76). Es entsteht der Peroxid-anion-Komplex von Cytochrom P-450. Durch Aufnahme von Protonen könnte dieser Komplex unter Abgabe von H_2O_2 zerfallen. In diesem Falle tritt der Enzym-Substrat-Komplex erneut beim ersten Schritt in den Kreislauf ein.
- 5) Beim Fortgang im Zyklus erfolgt im 5. Schritt die Abgabe eines Moleküls Wasser, wodurch sich ein Oxen-Cytochrom-P-450-Substrat-Komplex ausbildet. Dieser an Fe^{3+} gebundene atomare Sauerstoff wird als die katalytische Sauerstoff-Spezies angesehen.
- 6) Im letzten Schritt wird das Sauerstoffatom in das Substrat inkorporiert. Der Komplex zerfällt in hydroxyliertes Substrat und Cytochrom P-450, das im oxidierten Zustand vorliegt und wieder für einen neuen Eintritt in den Zyklus bereit ist.

Was die Entstehung von Wasserstoffperoxid betrifft, so wird sein Erscheinen im vierten Reaktionsschritt diskutiert (23, 104). Aber auch der Oxycytochrom-P-450-Substrat-Komplex (Schritt 3) könnte ein Superoxid-Anion (O_2^-) abgeben. Die Superoxiddismutase würde O_2^- dann in Wasserstoffperoxid überführen.

1.2. Durch Cytochrom P-450 katalysierte Reaktionen

Bei den von ihm katalysierten Reaktionen kann Cytochrom P-450 drei verschiedene Funktionen ausüben (21):

- 1) Als Oxygenase führt es zur Bildung von hydroxyliertem Substrat und Wasser.
- 2) Bei seiner Tätigkeit als Oxidase ist das Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid.
- 3) Durch Peroxidation von Substraten entsteht oxidiertes Substrat und Wasser (82). Cytochrom P-450 katalysiert die Hydroxylierung eines Substrates in Abwesenheit von NADPH, molekularem Sauerstoff und NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase. Der Sauerstoff für die Hydroxylierung stammt von organischen Peroxiden oder auch vom H_2O_2 (4, 5). Die Funktion als Peroxidase ist erst in den letzten Jahren erkannt worden und in ihrer Bedeutung noch nicht zu übersehen.

Die Aktivität der Oxidase ist in Inkubationsansätzen mit Mikrosomen anhand der Wasserstoffperoxidbildung meßbar. Auch ohne ein zugegebenes Substrat findet eine H_2O_2 -Bildung statt. Sie wird auf die Verstoffwechselung endogener Substanzen zurückgeführt, deren Natur noch weitgehend unbekannt ist (26). Diese von exogener Substratzufuhr unabhängige, "endogene" H_2O_2 -Bildung ist bei verschiedenen Tierespezies von unterschiedlicher Intensität. Sie liegt bei Lebermikrosomen von Kaninchen um etwa 3 Nanomol/mg min, bei Meerschweinchen bei ca. 4 Nanomol/mg min und erreicht bei Ratten 6 Nanomol/mg min. Auch durch Induktion kann sie beeinflußt werden. Nach Phenobarbital-Behandlung steigt die substratunabhängige Wasserstoffperoxidbildung bei Ratten und Meerschweinchen auf etwa das Doppelte des Kontrollwertes an, also auf 12 bzw. 7 Nanomol/mg min (38).

Bestimmte Substrate, die von Cytochrom P-450 hydroxyliert werden, führen zu einer erheblichen Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung. Zu ihnen gehören z.B. Hexobarbital, Flavon und Coumarin (36, 47, 105). Daneben können auch bestimmte Substanzen, die nur eine Bindung mit Cytochrom P-450 eingehen, aber nicht oxidiert werden, eine Steigerung der mikrosomalen H_2O_2 -Bildung hervorrufen. Zu diesen Stoffen gehört z.B. Perfluoro-n-hexan (58, 97). Diese Substanzen, die eine starke Zunahme des NADPH- und des O_2 -Verbrauches hervorrufen, ohne daß eine stoichiometrische Substrathydroxylierung erfolgt, nennt man Entkoppler bzw. Aktivatoren (36, 45, 6, 105). Sie können zu einer erheblichen Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung führen. Durch diese Stoffe wird demnach die Oxidasetätigkeit zuungunsten der Oxigenaseaktivität bevorzugt. Über den Mechanismus dieser Regulation besteht noch weitgehend Unklarheit. Als Erklärung wird die Kompetition von Oxidase- und Oxigenasefunktion von einigen Autoren diskutiert (38). Hildebrandt et al. (48) zeigten, daß die Bildung eines binären Komplexes aus Hexobarbital · Cytochrom P-450 mit NADPH · (NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase) limitierend für die Substratstimulierte H_2O_2 -Bildung ist.

Nimmt man als Substrat Hexobarbital, so steigt die H_2O_2 -Bildung in Lebermikrosomen nicht-behandelter Meerschweinchen und Kaninchen auf das etwa 3-fache, bei Ratten auf den etwa 1,5-fachen Wert an. Zusätzlich führt Induktion mit Phenobarbital zu einer Steigerung der H_2O_2 -Bildung bei Ratten auf das 4-fache, bei Meerschweinchen auf das 7-fache und bei Kaninchen auf das 14-fache, wenn man als Ausgangswert die endogene Wasserstoffperoxidbildung bei unbehandelten Tieren zugrundelegt (38). Außer von Substrat, Induktion und Tierspezies ist die Enzymaktivität auch noch von Faktoren wie Alter und Geschlecht der Tiere abhängig (56, 81, 90, 93).

1.3. Bindungsspektren von Cytochrom P-450 und Substrat

Bevor eine Reaktion stattfindet, muß ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet werden, der mit Hilfe von differenzspektrometrischen Methoden nachgewiesen werden kann (91). Durch die Bindungsspektren lassen sich mindestens zwei Substanzklassen unterscheiden (50, 84, 92). Die beiden unterschiedlichen Spektren, die gebildet werden, sind charakterisiert durch die Wellenlänge, bei denen sie ihre Maxima und Minima haben. Hexobarbital verursacht ein sogenanntes Typ-I-Spektrum mit einem Maximum bei 385 nm und einem Minimum bei 420 nm. Ein Typ-II-Spektrum wird z.B. von Metyrapon und Anilin hervorgerufen mit einem Peak bei 426 nm und einem Tal bei 390 nm (siehe Abb. 2).

Wie groß die erzielte Absorptionsänderung ist, ist abhängig von der verwendeten Substanz und von der Konzentration an Cytochrom P-450. Diese variiert von Versuchstier zu Versuchstier und bei Induktion. Vorbehandlung von Ratten mit Phenobarbital führt zu einer verstärkten Ausprägung des Spektrums für Hexobarbital und Anilin. Bei Induktion mit 3-Methylcholanthren zeigt sich dagegen nur für Anilin eine größere Bindungsfähigkeit (94). Ein Maß für die Affinität des Substrates zu Cytochrom P-450 ist die spektrale Dissoziationskonstante K_s .

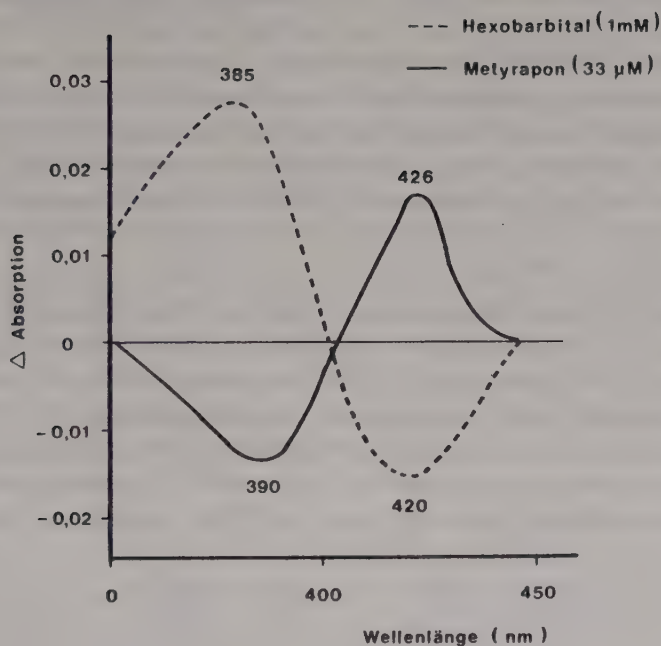


Abb. 2: Spektrum eines Typ-I-Substrates (Hexobarbital) und eines Typ-II-Substrates (Metyrapon) mit Cytochrom P-450. Verwendet wurden Mikrosomen von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten mit einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml (Hexobarbital) bzw. 2 mg/ml (Metyrapon).

1.4. Cytochrom-P-450-Isoenzyme

Versuche, Cytochrom P-450 rein darzustellen, haben bei verschiedenen Spezies und Organen zu einem befriedigenden Ergebnis geführt (10, 62). Aus *Pseudomonas putida* konnte es zuerst in kristalliner Form isoliert werden (106). Mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung wurde gezeigt, daß es verschiedene Cytochrom-P-450-Arten gibt (31, 34). Diese Isoenzyme werden durch verschiedene sogenannte Enzyminduktoren vermehrt, haben eine unterschiedliche Substratspezifität und sind durch spezifische Inhibitoren hemmbar (9, 73 102).

Induktion: Enzyminduktoren führen zu einer qualitativen und quantitativen Veränderung von Cytochrom P-450 (40, 87). Nach Gabe von Phenobarbital und 3-Methylcholanthren an Ratten steigt die Cytochrom-P-450-Konzentration auf das zwei- bis dreifache. Durch Immunopräzipitation mit monospezifischen Antikörpern wurde gefunden, daß dann eine für den jeweiligen Induktor spezifische Cytochrom-P-450-Fraktion überwiegt, die bei Kontrolltieren nur einen Anteil von etwa 10 % am Gesamtgehalt hat (32).

Substratspezifität: Mit der Induktion geht auch eine Veränderung im Arzneimittelstoffwechsel einher (1, 57, 79, 83, 95). Während die durch Phenobarbital induzierte Cytochrom-P-450-Fraktion z.B. die Hydroxylierung von Testosteron in 16 α -Position und die Demethylierung von Benzphetamin katalysiert, hat das durch 3-Methylcholanthren vermehrte Isoenzym eine hohe katalytische Aktivität für die Hydroxylierung von Zoxazolamin und die O-Dealkylierung von 7-Ethoxycoumarin (87).

Hemmstoffe: Durch Substanzen, die an Cytochrom-P-450 als Inhibitoren wirken, werden die Isoenzyme unterschiedlich beeinflusst. Einer der wichtigsten Hemmstoffe ist Metyrapon. Seine Bindung an die durch Phenobarbital induzierte Cytochrom-P-450-Spezies ist so spezifisch, daß sie zu ihrer

Quantifizierung verwendet wird (67, 70).

1.5. Verwendung von Metyrapon als Hemmstoff der mischfunktionellen Oxidasen

Metyrapon ist ein seit langem gebrauchter Hemmstoff bei Untersuchungen zum Arzneimittelabbau an Cytochrom P-450. Als kompetitiver Inhibitor der 11 β -Hydroxylase in der Nebennierenrinde findet er auch klinisch eine Anwendung (63, 88). Mit Cytochrom P-450 bildet Metyrapon ein Typ-II-Spektrum (42, 74). Im Gegensatz zu anderen Typ-II-Substraten wird es auch an reduziertes Cytochrom P-450 gebunden (41). Bei den bisher von verschiedenen Autoren untersuchten Reaktionen ruft Metyrapon keinen einheitlichen Effekt hervor. So wird für die N-Demethylierung von Amidopyrin und Äthylmorphin durch Mikrosomen von Ratten eine nicht-kompetitive Hemmung für den mikromolaren Bereich beschrieben, bei Konzentrationen um 10^{-4} M dagegen eine kompetitive Hemmung (85, 86). Da der K_i -Wert im Falle der nicht-kompetitiven Hemmung mit 2 μ M im Bereich der Cytochrom-P-450-Konzentration lag, konnten Gleichungen für ein sog. "mutual depletion system" angewandt werden, um die Konzentration der katalytischen Zentren und deren Umsatzzahl zu errechnen (86). Die Hydroxylierung von Acetanilid wird mit niedrigen Metyraponkonzentrationen stimuliert. Hemmung dieser Reaktion tritt erst in Konzentrationsbereichen oberhalb 10^{-2} M auf (59).

1.6. Fragestellung

Metyrapon wirkt hauptsächlich auf eine Subfraktion von Cytochrom P-450, die sich durch Behandlung der Tiere mit Phenobarbital induzieren läßt und gibt damit die Möglich-

keit, diese Cytochrom-P-450-Spezies auch in Mikrosomen relativ selektiv zu untersuchen. Es sollte die Wirkung von Metyrapon auf die Oxidaseaktivität in Lebermikrosomen der Ratte und des Meerschweinchens getestet werden.

Folgende Fragen standen im Vordergrund:

- 1) Wie wirkt Metyrapon auf die Substrat-unabhängige ("endogene") H_2O_2 -Produktion?
- 2) Welche enzymkinetischen Bedingungen ergeben sich bei der Wirkung von Metyrapon auf die Hexobarbital-stimulierte H_2O_2 -Bildung? Bestehen die Voraussetzungen für die Anwendung der Gleichungen eines "mutual depletion system"?
- 3) Ergibt sich ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der Oxidase-Aktivität und der Reduktion der Typ-I-Bindungsspektren von Hexobarbital durch Metyrapon?

2. **METHODEN**

2.1. Versuchstiere

Versuchstiere waren männliche Albino-Meerschweinchen (Buchner, Kienberg) mit einem Gewicht von 250 - 400 g und Ratten (Sprague-Dawley-Ratten von Mus Rattus, Brunnthal), die 150 - 200 g wogen. Sie bekamen als Standardfutter Al-tromin^R und Wasser ad libitum. Das Futter wurde ca. 12 Stunden vor Versuchsbeginn entfernt. Ein Teil der Tiere wurde nicht behandelt. Bei den übrigen erfolgte eine Vcr-behandlung mit Phenobarbital (PB). An drei aufeinanderfolgenden Tagen bekamen die Meerschweinchen morgens eine Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht und die Ratten 80 mg/kg Körpergewicht i.p. Am ersten Tag wurde diese Behandlung nach 8 - 10 Stunden wiederholt. Die letzte Dosis bekamen die Tiere ca. 24 Stunden vor Versuchsbeginn. Bei einigen Tieren wurde die Behandlungsdauer modifiziert (Meerschweinchen 1 bis 8 Tage, Ratten 1 bis 4 Tage).

2.2. Bereitung der Mikrosomen

Die Mikrosomenpräparation erfolgte nach der Methode von Hogeboom, die leicht modifiziert wurde (49). Nachdem die Tiere dekapitiert worden waren, wurde die Leber herauspräpariert und bei Meerschweinchen die Gallenblase entfernt. Die weitere Aufbereitung der Leber erfolgte bei 4° C. Die Leber wurde in 0,25 M Saccharoselösung mit der Schere zerkleinert und mehrfach gespült. Dann kamen die Leberstücke im Verhältnis von 1 : 10 mit obiger Lösung in ein Homogenisiergerät (B. Braun, Melsungen) und wurden bei 1000 U/min homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension in einer Kühltzentrifuge (Sorvall-Superspeed, 2-B, Rotor Typ SS-34) 10 Minuten bei 1700 g und der Überstand noch einmal 20 Minuten bei 19000 g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand

in einer Ultrazentrifuge (Beckman-L 2, 65 B, Rotor Typ 30) 45 Minuten bei 105 000 g zentrifugiert. Die jetzt im Bodensatz befindlichen Mikrosomen wurden mit 0,15 M KCl suspendiert, homogenisiert und noch einmal bei 105 000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden dann in einer Lösung aus 50 mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris), 150 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ und 250 mM Saccharose, pH 7,5, gelöst.

2.3. Eiweißbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Mikrosomen wurde nach der von Gornall modifizierten Biuret-Methode bestimmt (28). Dabei entsteht proportional zur Eiweißkonzentration eine Verbindung, die bei 545 nm photometrisch gemessen werden kann. Die Messung wurde in einem Zeiss Photometer PMQ 2 vorgenommen. Albumin diente als Standard. Anschließend wurde die Mikrosomensuspension mit Tris-Saccharose auf 7,5 mg Protein/ml verdünnt.

2.4. Inkubation

Die Inkubation wurde in 100-ml-Erlenmeyer-Kolben bei einer Temperatur von 30° C im Wasserbad durchgeführt. Im Inkubat waren enthalten (Gesamtvolumen 7,5 ml):

- 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5
- 150 mM KCl
- 10 mM $MgCl_2$
- 8 mM DL-Isozitronensäure-Trinatriumsalz-Dihydrat
(Fa. Carl Roth OHG, Karlsruhe)
- 150 mU Isocitrat-Dehydrogenase
(Boehringer, Mannheim; spez. Aktivität 2 U/mg)
- 3000 U Katalase (Boehringer, Mannheim) pro ml Inkubat
- 50 mM Methanol
- 400 μ M NADPH₂ (Boehringer, Mannheim)
- 1,5 mg Protein/ml in Form der verdünnten Mikrosomensuspension

sion sowie Hexobarbital (Hexobarbital-Natrium; Evipan-Amp., Fa. Bayer) und Metyrapon in verschiedenen Konzentrationen, die je nach Aufgabenstellung variiert wurden:

- a) Bei Versuchen zur Darstellung des Hemmtyps von Metyrapon bildeten 6 bzw. 7 Hexobarbitalkonzentrationen zwischen 0,05 und 8 mM jeweils eine Versuchsreihe, wobei die Metyraponkonzentration von Reihe zu Reihe zwischen 0 und 5 μM variiert wurde.
- b) Zur Quantifizierung der Hemmung wurde die Hexobarbitalkonzentration von 1 mM während des ganzen Versuches konstant gelassen und die Metyraponkonzentration von 10^{-7} bis 10^{-4} M variiert.

Unabhängig davon waren bei der Inkubation folgende Variationen des Ansatzes nötig:

- 1) Zur Bestimmung der sogenannten endogenen H_2O_2 -Bildung erfolgte ein Ansatz ohne Hexobarbital und ohne Metyrapon. Das fehlende Volumen wurde mit Tris-Puffer ausgeglichen.
- 2) Um die Frage nach der Hemmbarkeit der endogenen H_2O_2 -Bildung zu beantworten, wurde von jeder Metyraponkonzentration ein Ansatz ohne Hexobarbital durchgeführt. Der Volumenausgleich erfolgte auch hier mit Tris-Puffer.
- 3) Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der unehemmten Reaktion wurde für jede Hexobarbitalkonzentration ein Ansatz ohne Metyrapon durchgeführt und das Volumen mit Tris-Puffer ausgeglichen.

Die Erlenmeyerkolben wurden 5 Minuten bei 30° C unter Schütteln im Wasserbad vorinkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von NADPH_2 gestartet. Mit einer 1-ml-Eppendorf-Pipette wurden nach 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten jeweils 1 ml des Inkubates entnommen und in Reagenzgläser gegeben, die 1 ml einer 15 %igen Trichloressigsäure-Lösung enthielten. Dadurch wurde das Eiweiß gefällt und damit die Reaktion gestoppt. Die Suspension wurde anschließend bei

3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Das Eiweiß befand sich dann im Sediment, das nachzuweisende Formaldehyd (siehe unten) im klaren Überstand.

2.5. H₂O₂-Bestimmung

Die Bestimmung des bei der Inkubation entstandenen Wasserstoffperoxids erfolgte indirekt. H₂O₂ reagiert in Gegenwart von Katalase mit Methanol, und es entsteht HCHO (46). Dieses ergibt mit Acetylaceton und Ammoniumacetat (Nash-Reagenz) Diacetyldihydrolutidine, dessen gelbe Farbe bei 412 nm photometrisch gemessen werden kann (72).

Von dem Überstand wurden 1,5 ml von einer automatischen Pipette (Dilumatik, B. Braun Melsungen) angesaugt und zusammen mit 1,5 ml Nash-Reagenz in ein Reagenzglas gegeben. Nach Inkubation im Wasserbad bei 58° C für 8 Minuten nach Abkühlen der Proben zeigte sich eine gelbe Farbe, die im Photometer bei 412 nm in 2-cm-Küvetten gegen aqua bidest. gemessen wurde.

2.6. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit

Die Umrechnung der gemessenen Extinktion in die Konzentration an Formaldehyd erfolgte mit Hilfe einer Eichreihe. Hierfür wurden dem üblichen Inkubat definierte Mengen einer HCHO-Lösung zugesetzt. Unmittelbar nach dem Mischen wurden davon 1 ml in Trichloressigsäure gegeben und nach der oben beschriebenen Weiterverarbeitung die Extinktion gemessen. Bei Auftragung der Extinktion gegen die Formaldehydkonzentration ergibt sich eine Gerade. Ihre Steigung ergibt den mikromolaren Extinktionskoeffizienten, mit dessen Hilfe man aus einer gemessenen Extinktion die spezifische Aktivität in Nanomol HCHO/mg Protein · min errechnen kann. Die so gemessene H₂O₂-Bildung ist die Summe aus substrat-induzierter und endogener Aktivität:

$$\text{gemessenes H}_2\text{O}_2 = \text{substratinduziertes H}_2\text{O}_2 + \text{endogenes H}_2\text{O}_2$$

Die von Hexobarbital abhängige Wasserstoffperoxidbildung erhält man, wenn man von dem gemessenen Wert die endogene Aktivität abzieht.

2.7. Bestimmung von Cytochrom P-450

Die Bestimmung von Cytochrom P-450 erfolgte nach der von Omura und Sato angegebenen Methode mit einem Aminco^R Doppelstrahl-Spektrometer (77). Dazu wurde die Mikrosomen-suspension mit Tris-Puffer auf eine Konzentration von 1,5 mg Protein/ml verdünnt. Jeweils 3 ml dieser Lösung wurden in die Proben- und in die Referenz-Küvette gegeben und die Basislinie im Bereich von 380 - 500 nm geschrieben. Anschließend wurde in beide Küvetten etwas Natriumdithionit gegeben, um den in der Lösung vorhandenen Sauerstoff zu binden. Es resultiert eine neue Basislinie, die im interessierenden Bereich nur unwesentlich von der alten abweicht. Die Lösung der Probenküvette wurde dann mit CO 1 min begast. Die Extinktionsänderung des entstandenen Cytochrom-P-450-CO-Komplexes des reduzierten Cytochroms kann bei 450 nm gegen 490 nm aus der Aufzeichnung abgelesen werden (20, 25). Die Berechnung der Cytochrom-P-450-Konzentration erfolgte mit Hilfe des millimolaren Extinktionskoeffizienten von 91 /mM cm (78).

2.8. Messung der Substrat-Bindungsspektren

Die Messung der Bindungsspektren erfolgte mit demselben Gerät wie die Cytochrom-P-450-Bestimmung. Verwendet wurden Mikrosomen von Ratten und Meerschweinchen, von Kontrollen und PB-Tieren. Jeweils 3 ml der mit Puffer auf 1,5 mg Protein/ml verdünnten Mikrosomenlösung wurden in Proben-

und Referenzküvette gegeben und die Basislinie geschrieben. Dann wurden 50 μ l einer 60 mmolaren Hexobarbitallösung in die Probenküvette gegeben und damit eine Konzentration von 1 mM Hexobarbital erreicht. Der Volumenausgleich erfolgte in der Referenzküvette mit aqua bidest. Wie Abb. 2 zeigt, entstand ein Typ-I-Bindungsspektrum mit einem Absorptionsminimum bei 385 nm und einem Maximum bei 420 nm. Dann wurde mit einer Hamilton-Spritze eine 500 μ molare Lösung Metyrapon in beide Küvetten gegeben und nach Durchmischung das veränderte Bindungsspektrum aufgezeichnet. Dieses Verfahren wurde mit steigenden Volumina Metyraponlösung so lange wiederholt, bis sich auch bei Zugabe hoher Konzentrationen nur noch eine geringfügige Veränderung des Spektrums erzielen ließ. Die Extinktion wurde auf 1 mg Protein umgerechnet.

2.9. Statistische Berechnungen

Die Ergebnisse aus Einzelexperimenten wurden gemittelt und die Standardabweichung des Mittelwertes (S.D.) berechnet. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests für nicht gepaarte Stichproben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Endogene H_2O_2 -Bildung

a) Meerschweinchen

Die endogene H_2O_2 -Bildung in Lebermikrosomen beträgt bei nicht-behandelten Meerschweinchen 2,1 Nanomol/mg min ($n = 13$, S.D. = 1,0). Eine 3-tägige Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital führt zu einer Erhöhung der Aktivität auf 5,8 Nanomol/mg min ($n = 9$, S.D. = 2,7) und damit zu einem Anstieg auf mehr als das Doppelte (s. Tabelle 1).

Über den Einfluß von Metyrapon auf die endogene Wasserstoffperoxidbildung sind Werte aus 13 Versuchen vorhanden, von denen 4 mit unbehandelten und 9 mit PB-Tieren mit unterschiedlicher Behandlungszeit gemacht wurden. Bei unbehandelten Meerschweinchen ließ sich ein Einfluß von Metyrapon auf die endogene H_2O_2 -Bildung nicht erkennen (s. Abb. 3).

Ein unheitliches Verhalten zeigten Mikrosomen von Phenobarbital-vorbehandelten Tieren. In der Mehrzahl der Experimente ($n = 6$) ließ sich eine Hemmung nachweisen. Bei den höchsten Metyraponkonzentrationen (10^{-4} M) betrug die Reaktionsgeschwindigkeit nur noch 70 - 90 % des Ausgangswertes. Ein deutlicher Abfall erfolgte erst bei Konzentrationen über 10^{-6} M, diesen Bereich zeigt Abb. 3. Eine Stimulierung der H_2O_2 -Bildung mit ansteigender Metyraponkonzentration trat bei vorbehandelten Tieren in 2 Versuchen auf. Die dabei ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten lagen bis zu 50 % über dem Ausgangswert.

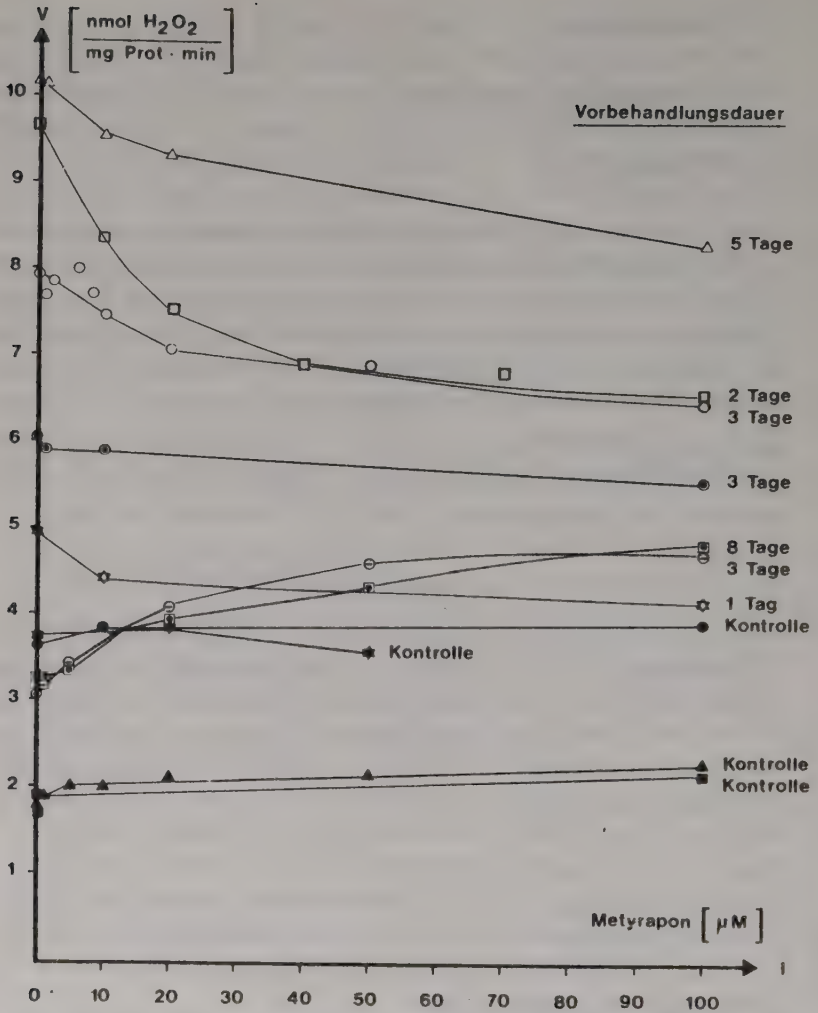


Abb. 3: Wirkung von Metirapon auf die endogene H_2O_2 -Bildung in Lebermikrosomen von Meerschweinchen. Die Vorbehandlungsdauer mit Phenobarbital ist an den Kurven angegeben.
Versuchsaufbau wie in "Methoden" beschrieben mit 1,5 mg Protein/ml in der Inkubationslösung.

b) Ratten

Bei unbehandelten Tieren beträgt die mikrosomale Bildungsgeschwindigkeit von Wasserstoffperoxid 6,0 Nanomol/mg min (S.D. = 1,1, n = 4). Nach einer 3-tägigen Vorbehandlung mit Phenobarbital ist sie auf 12,8 Nanomol/mg min angestiegen (n = 7, S.D. = 4,6). Bei der Ratte ist die endogene H_2O_2 -Bildung damit mehr als doppelt so hoch wie in den entsprechenden Versuchen mit Meerschweinchen (s. Tab. 1). Unter dem Einfluß von Metyrapon findet sich bei dieser Tierart sowohl bei Kontrollen als auch bei PB-Tieren eine Hemmung der endogenen Wasserstoffperoxidbildung. Wie beim Meerschweinchen wird diese erst oberhalb einer Metyraponkonzentration von 10^{-6} M deutlich. Von dieser Konzentration an ist der Kurvenverlauf in Abb. 4 dargestellt.

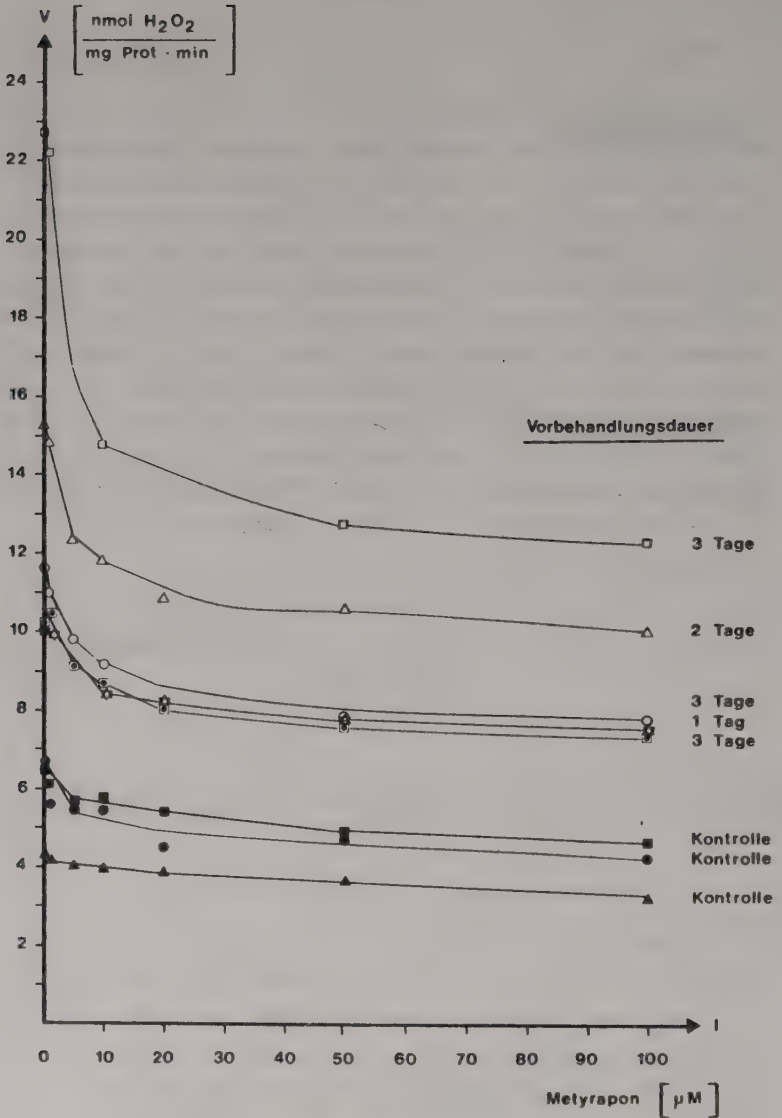


Abb. 4: Wirkung von Metyrapon auf die endogene mikrosomale H_2O_2 -Bildung bei Ratten. Die Vorbehandlungsdauer mit Phenobarbital ist an den Kurven angegeben.

M e e r s c h w e i n c h e n

Vorbehand- lung	n	endogene H_2O_2 - Bildung	n	Hexobarbital- abhängige H_2O_2 - Bildung
		$\frac{\text{Nanomol}}{\text{mg min}}$		$\frac{\text{Nanomol}}{\text{mg min}}$
-	13	2,1 S.D. = 1,0	11	4,1 S.D. = 1,2
PB	9	5,8 ** S.D. = 2,7	7	18,3 ** S.D. = 2,6

R a t t e

-	4	6,0 S.D. = 1,1	4	1,3 S.D. = 1,3
PB	7	12,8 * S.D. = 4,6	6	11,6 * S.D. = 2,8

Tab. 1: Einfluß von Phenobarbitalbehandlung und Hexobarbital auf die mikrosomale H_2O_2 -Bildung bei Ratten und Meerschweinchen. Zusammensetzung der Inkubationslösung wie unter "Methoden" beschrieben mit 1,5 mg/ml Protein und einer Hexobarbitalkonzentration von 1 mM.

Eine Prüfung der Werte von Kontrollen und von PB-Tieren auf Signifikanz ergab

* $p < 0,01$;

** $p < 0,001$

3.2. Substrat-abhängige H_2O_2 -Bildung

Bei der Zugabe von Hexobarbital tritt wie erwartet eine erhebliche Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung ein. Eine Übersicht über die ermittelten Durchschnittswerte gibt Tabelle 1.

a) Meerschweinchen

In Tabelle 2 ist der Einfluß der Vorbehandlungsdauer auf die Cytochrom-P-450-Konzentration und die H_2O_2 -Bildung dargestellt. Schon eine 2malige Gabe von Phenobarbital zeigt eine Wirkung auf die Cytochrom-P-450-Konzentration. Parallel dazu nehmen auch endogene und substratinduzierte H_2O_2 -Bildung zu. Bei einer Hexobarbitalkonzentration von 1 mM ist das Verhältnis endogene Wasserstoffperoxidbildung: substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung bei nicht behandelten Tieren 1 : 2, nach 3-tägiger Phenobarbitalbehandlung etwa 1 : 3.

Vorbehand- lung mit FB	n	Cytochrom P-450	n	endogene H_2O_2 - Bildung	n	Hexobarbital- abhängige H_2O_2 -Bildung
Tage		<u>Nanomol</u> mg		<u>Nanomol</u> mg min		<u>Nanomol</u> mg min
0	4	1,0 S.D. = 0,1	13	2,1 S.D. = 1,0	11	4,1 S.D. = 1,2
1	2	1,6	2	5,4	2	12,0
2	1	1,5	1	9,7	1	13,8
3	3	2,0 S.D. = 0,9	9	5,6 S.D. = 2,7	7	18,3 S.D. = 2,6
5	1	2,1	1	10,2	1	22,5
8	1	1,6	1	3,1	1	19,3

Tab. 2: Einfluß der Vorbehandlungszeit mit Phenobarbital auf die Cytochrom-P-450-Konzentration sowie endogene und substratinduzierte H_2O_2 -Bildung (Hexobarbitalkonzentration 1 mM) bei Meerschweinchen.

b) Ratten

Bei Ratten betreffen die Veränderungen nach PB-Behandlung hauptsächlich die Hexobarbital-stimulierte H_2O_2 -Produktion (Tab. 3). Diese beträgt bei Kontrollratten nur ein Bruchteil (0 - 50 %) der endogenen Wasserstoffperoxidbildung. Nach dreitägiger Vorbehandlung mit Phenobarbital liegen beide in etwa der gleichen Größenordnung. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten anderer Autoren überein (38).

Vorbehand- lung	n	Cytochrom P-450	n	endogene H_2O_2 - Bildung	n	Hexobarbital- abhängige H_2O_2 -Bildung
Tage		<u>Nanomol</u> mg		<u>Nanomol</u> mg min		<u>Nanomol</u> mg min
0	3	0,9 S.D. = 0,1	4	6,0 S.D. = 1,1	4	1,3 S.D. = 1,3
1	1	2,0	1	10,3	1	8,2
2	1	2,8	1	15,3	1	9,7
3	3	2,5 S.D. = 0,4	7	12,8 S.D. = 4,6	6	11,6 S.D. = 2,8
4	1	2,7	1	11,1	1	16,1

Tab. 3: Einfluß der Vorbehandlungszeit mit Phenobarbital auf die Cytochrom-P-450-Konzentration sowie endogene und substratinduzierte H_2O_2 -Bildung (Hexobarbitalkonzentration 1 mM) bei Ratten.

3.3. Kinetik der durch Metyrapon gehemmten substratinduzierten H_2O_2 -Bildung

a) Meerschweinchen

Abbildung 5 zeigt die Bildungsgeschwindigkeit von H_2O_2 in Abhängigkeit zur Hexobarbitalkonzentration unter dem Einfluß unterschiedlicher Metyraponkonzentrationen. Einem Experiment mit vorbehandelten Tieren wurde ein entsprechen-

der Versuch mit Kontrollen gegenübergestellt. Sowohl bei PB-Behandlung als auch bei unbehandelten Tieren erfolgt eine maximale Wasserstoffperoxidbildung bei einer Substratkonzentration von 2,5 mM. Das Maximum der ungehemmten Reaktion wird nach Zugabe von Metyrapon nicht mehr erreicht. Eine rein kompetitive Hemmung scheidet demnach aus. Auffällig bei beiden Versuchen ist die deutliche Hemmung, die schon von einer Inhibitorkonzentration von 10^{-7} M hervorgerufen wird.

Ein ähnliches Experiment mit Hexobarbitalkonzentrationen unterhalb der Substratsättigung zeigt Abbildung 6. Das Ergebnis sieht im Lineweaver-Burk-Diagramm für Kontrollen und für PB-Tiere unterschiedlich aus (Abb. 7). Im Gegensatz zu behandelten Meerschweinchen können die Meßpunkte bei nichtbehandelten Tieren nicht über den ganzen Meßbereich zu Geraden verbunden werden. Aus dieser Darstellung kann man auf einen mehrphasigen Kurvenverlauf schließen. Die Schnittpunkte der Kurven liegen in beiden Fällen im II. Quadranten, was einem gemischten Hemmtyp entspricht.

Der Unterschied zwischen behandelten und nichtbehandelten Tieren zeigt sich noch deutlicher, wenn man beide Experimente nach Dixon darstellt (Abb. 8). Bei PB-Meerschweinchen ergibt sich durch den Schnittpunkt der Geraden die Darstellung einer gemischten oder kompetitiven Hemmform. Dagegen bilden die entsprechenden Meßwerte bei Kontrolltieren Kurven, die in diesem Meßbereich aus 2 Phasen bestehen.

Experimente bei einer konstanten Hexobarbitalkonzentration (1 mM) und Metyraponkonzentration über einen breiteren Bereich (10^{-7} bis 10^{-4} M) sollten diese Mehrphasigkeit besser zeigen. Das Ergebnis bei Kontrollen und drei Tage vorbehandelten Tieren zeigt die Abbildung 9. Die Kurven sind jeweils aus den Mittelwerten mehrerer Versuche entstanden.

Bei Kontrolltieren fällt die H_2O_2 -Bildung mit Metyraponkonzentrationen bis $3 \cdot 10^{-5}$ M deutlich ab. Höhere Konzentrationen haben nur noch gering steigende Wirkung. Bei Phenobarbital-behandelten Meerschweinchen ist die Hemmung durch Metyrapon im gezeigten Konzentrationsbereich gleichmäßig.

Da die Empfindlichkeit für Metyrapon von der Vorbehandlung abzuhängen scheint, wurde die Vorbehandlungszeit der Tiere variiert. Um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, wurde die H_2O_2 -Bildung unter dem Einfluß des Inhibitors auf die Wasserstoffperoxidbildung der ungehemmten Reaktion normiert und gegen die Metyraponkonzentration aufgetragen. Das Ergebnis für Meerschweinchen zeigt die Abbildung 10. Während die Kurve bei nicht-behandelten Tieren in dieser halblogarithmischen Darstellung fast als Gerade verläuft, zeigen PB-Tiere, insbesondere bei Metyraponkonzentrationen zwischen 10^{-7} bis 10^{-5} M, einen davon abweichenden Kurvenverlauf. Die I_{50} -Werte, die sich aus diesen Kurven ablesen lassen, sind für PB-Meerschweinchen etwas höher (s. Tab. 4). Bei einer Metyraponkonzentration von 10^{-4} M beträgt die substratinduzierte Wasserstoffperoxidbildung nach 3-tägiger Phenobarbitalbehandlung noch 8,5 % ($n = 3$, S.D. = 3,4) des Ausgangswertes. Bei unbehandelten Tieren liegt sie noch bei 20,4 % ($n = 4$, S.D. = 6,0) der ungehemmten Reaktion.

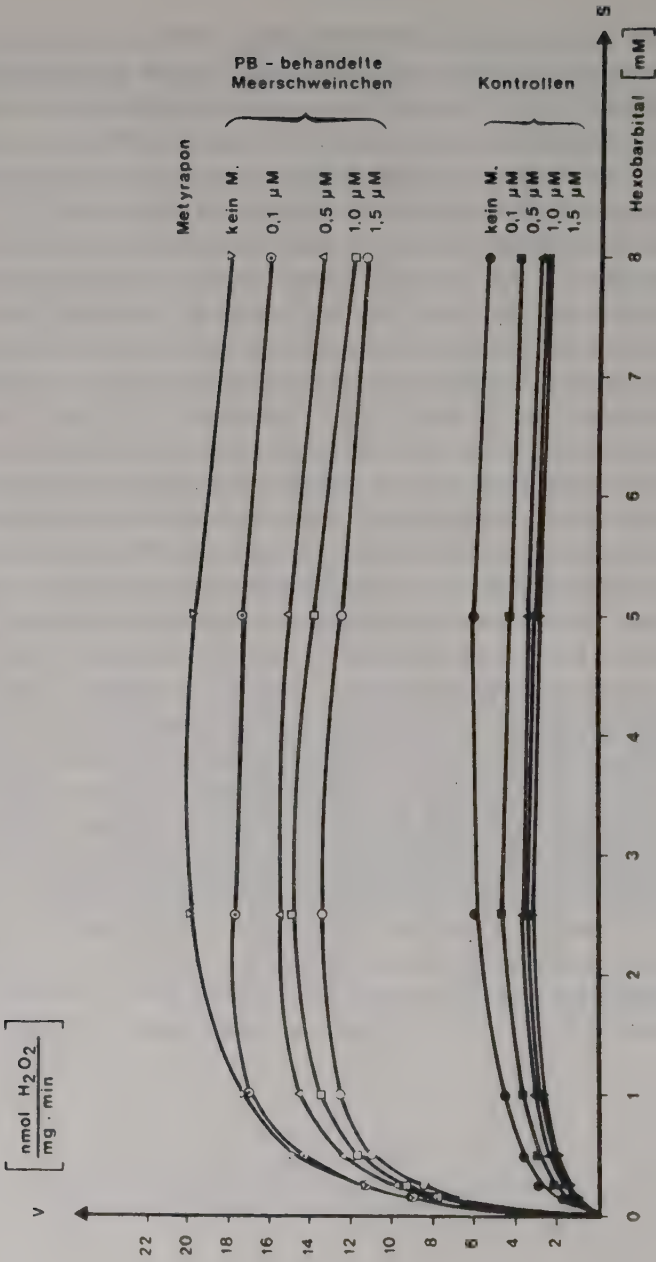


Abb. 5: Wirkung unterschiedlicher Metyraponkonzentrationen auf die Substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung bei PB-Meerschweinchen bzw. Kontrollen (Experiment 1).

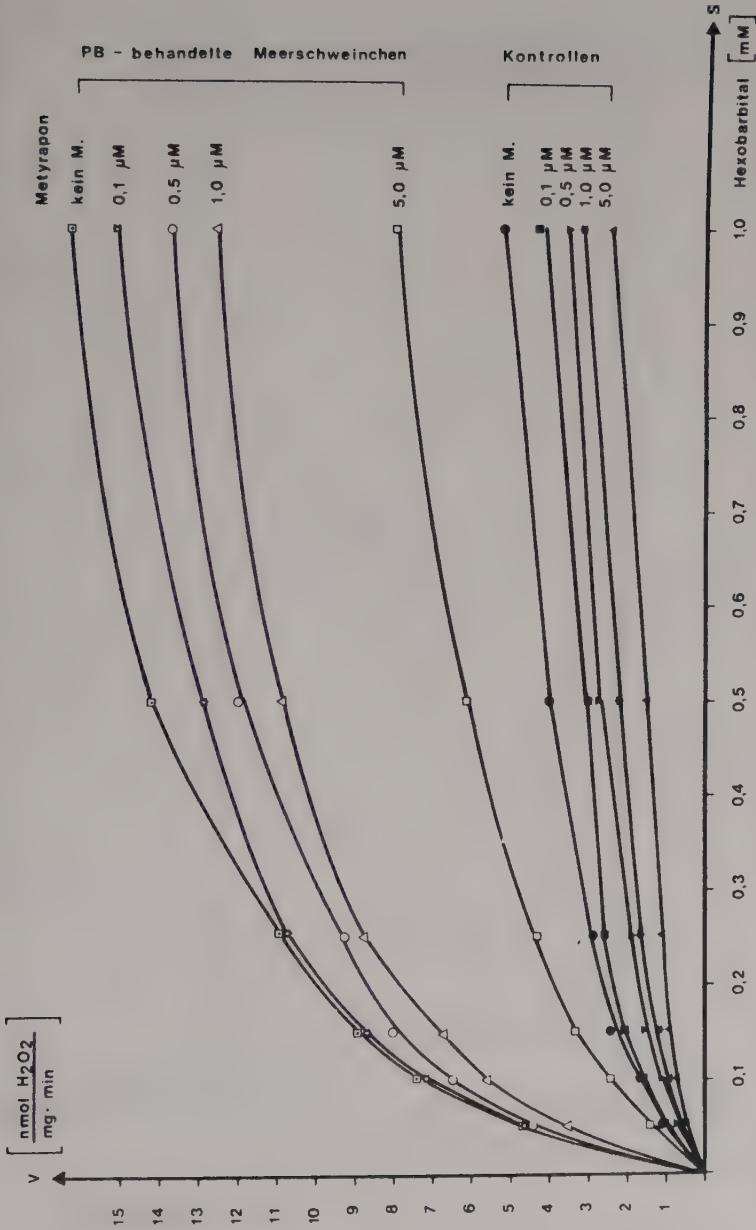


Abb. 6: Wirkung unterschiedlicher Metyraponkonzentrationen auf die Substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung bei PB-Meerschweinchen bzw. Kontrollen (Experiment 2)

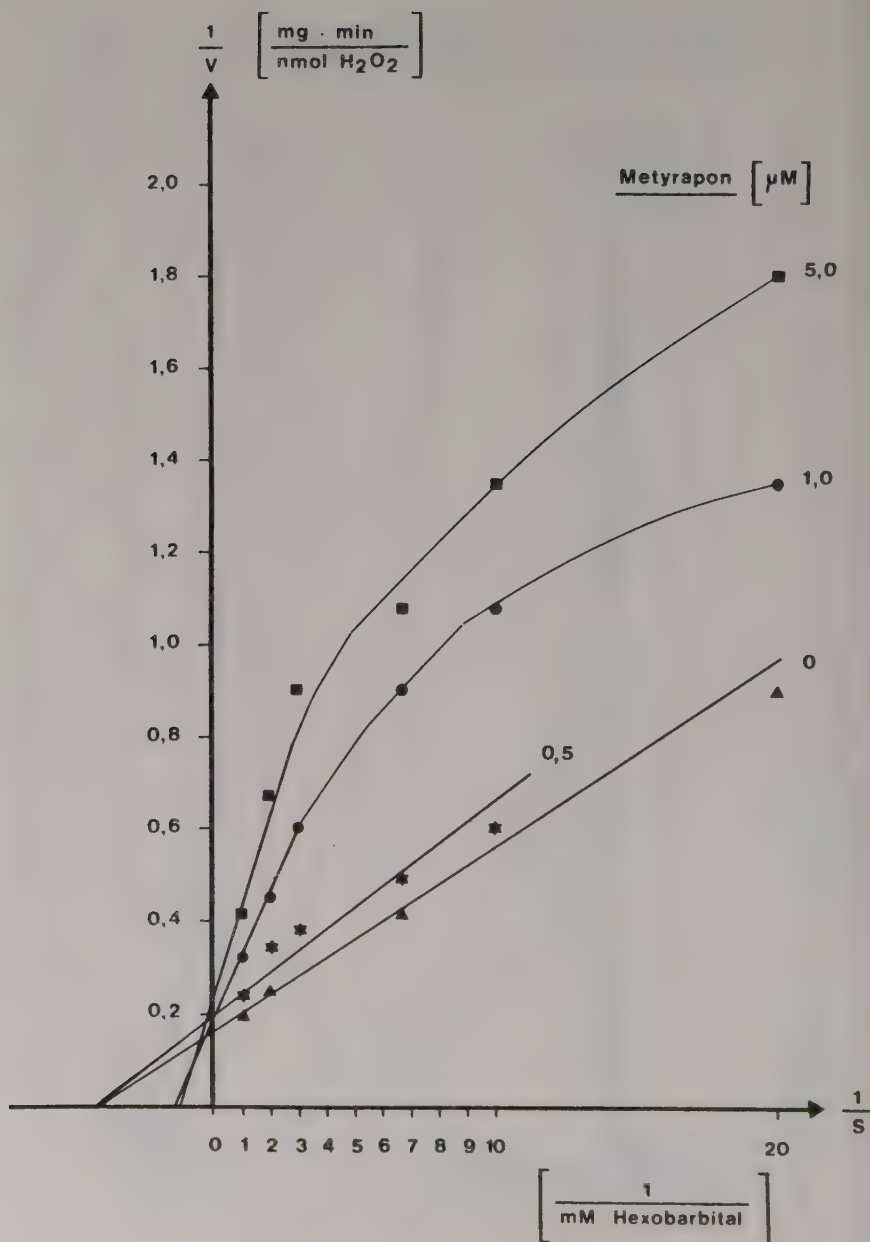
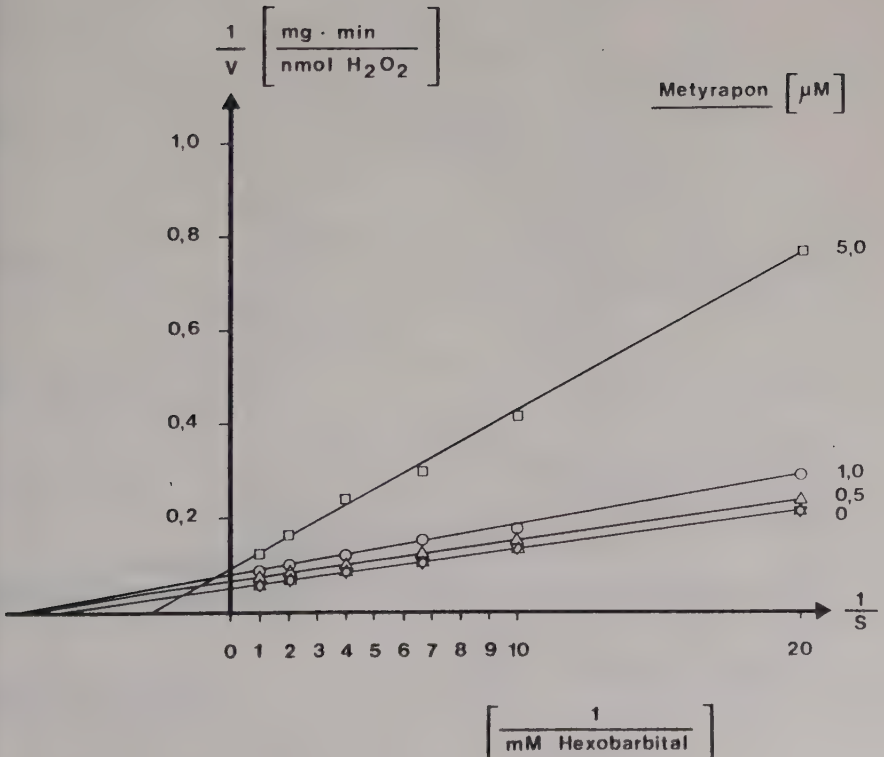


Abb. 7: Darstellung der durch Hexobarbital induzierten H_2O_2 -Bildung unter dem Einfluß von Metyrapon bei Kontrollen (linke Seite) und bei Phenobarbital-behandelten Meerschweinchen (rechte Seite) (Lineweaver-Burk-Diagramm). Werte aus Abb. 6.



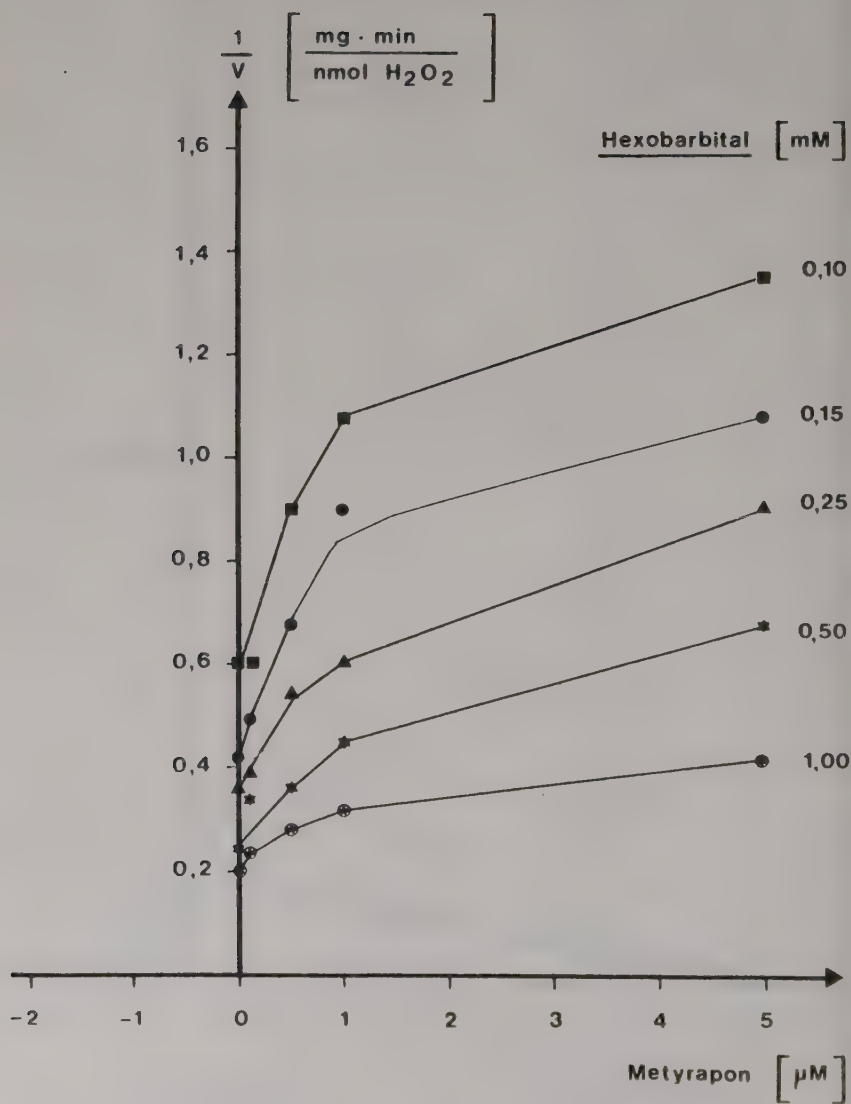
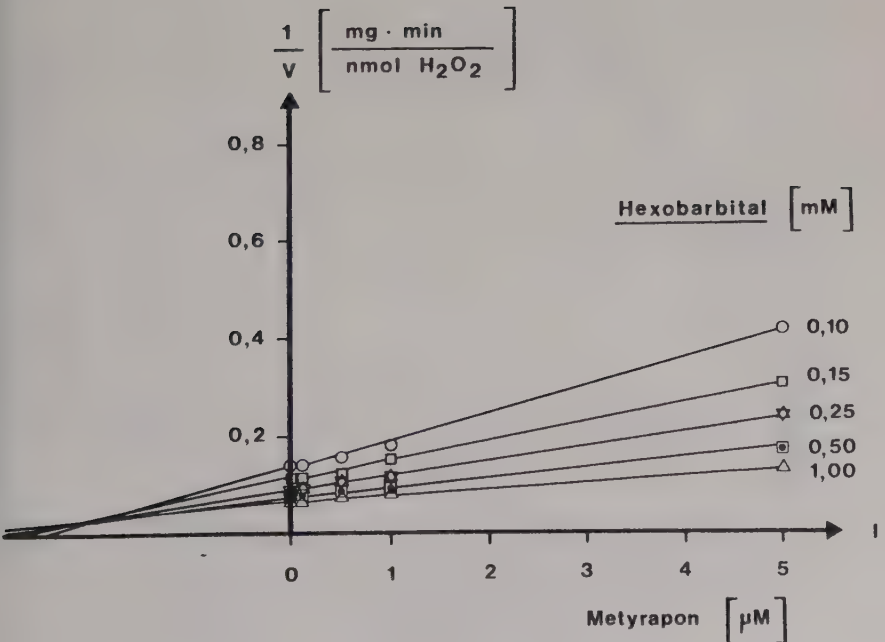


Abb. 8: Dixon-Diagramm der Hexobarbital-induzierten H_2O_2 -Bildung unter dem Einfluß von Metyrapon bei Kontrollen (linke Seite) und bei Phenobarbital-behandelten Meerschweinchen (rechte Seite). Werte der Abb. 6.



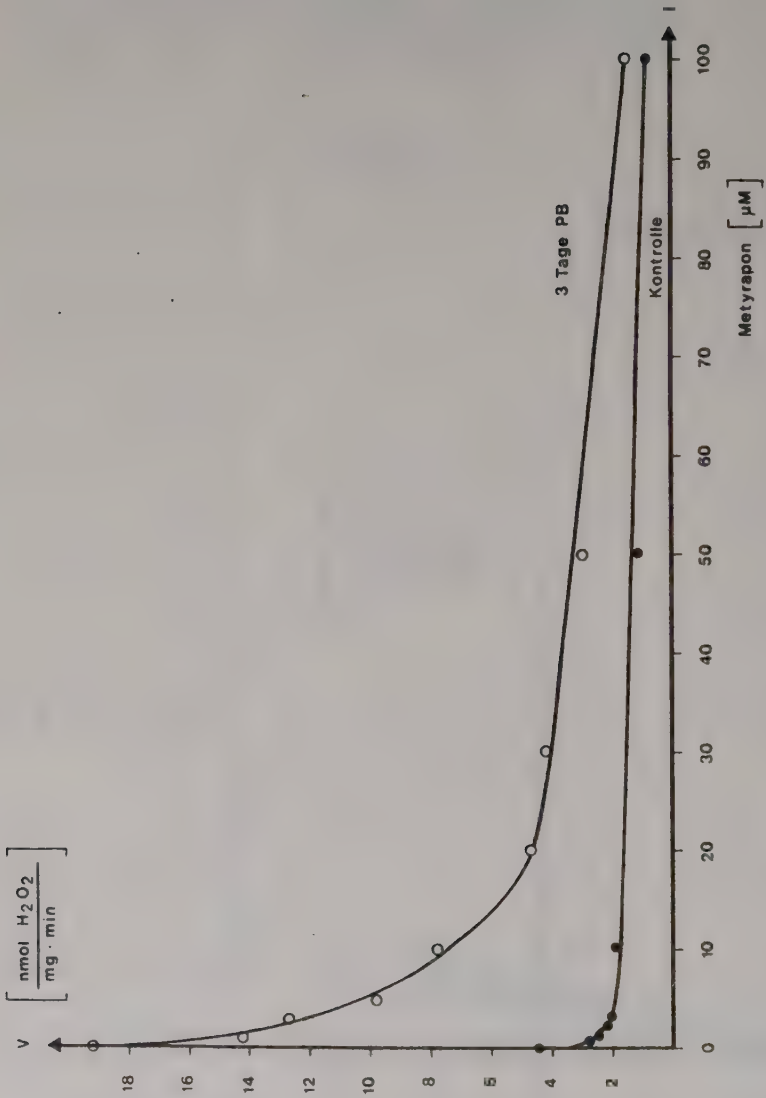


Abb. 9: Einfluß von Metyrapon auf die Substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung bei Kontrollen und PB-Meerschweinchen. Hexobarbitalkonzentration 1 mM. Kontrolle n = 5, PB n = 4

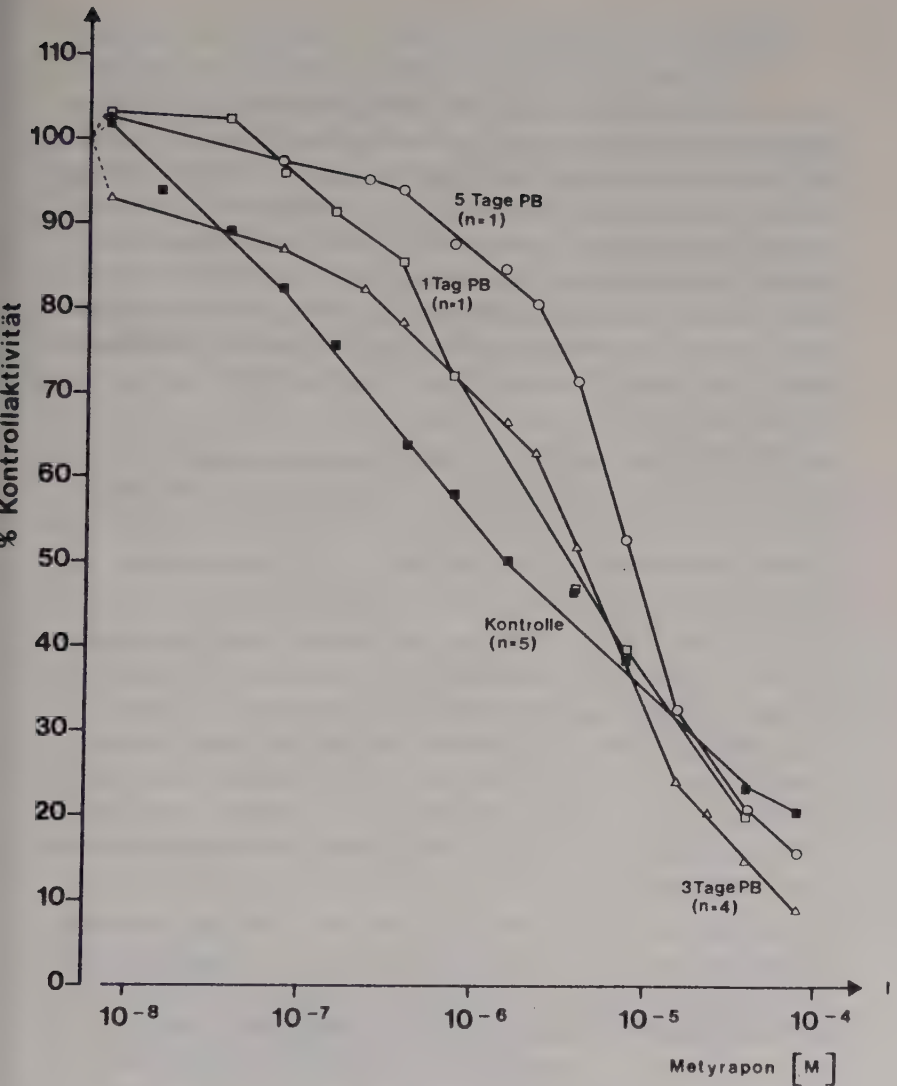


Abb. 10: Einfluß der Vorbehandlungszeit auf die Hemmbarkeit der Hexobarbital-abhängigen H_2O_2 -Bildung durch Metyrapon beim Meerschweinchen.

b) Ratten

Unter Kontrollbedingungen ist die Hexobarbital-abhängige Wasserstoffperoxidbildung bei Ratten so gering, daß Änderungen der Bildungsgeschwindigkeit nahe der Nachweisgrenze liegen. Bei Metyraponkonzentrationen $< 0,5 \mu\text{M}$ scheint die Reaktion stimuliert zu werden (s. Abb. 11). Nach einer 3-tägigen Vorbehandlung mit Phenobarbital zeigt die H_2O_2 -Bildung ein ähnliches Verhalten gegen Metyrapon wie in analogen Experimenten an PB-Meerschweinchen (s. Abb. 11). Lineweaver-Burk- und Dixon-Diagramm weisen auch bei PB-Ratten auf einen gemischten Hemmtyp hin (s. Abb. 12 und 13).

Der Verlauf der Kurve über einen Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-4} M Metyrapon kann in Abbildung 14 verfolgt werden. Bei vorbehandelten Tieren ist die Hemmung bis zu einer Metyraponkonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ M besonders ausgeprägt, sie steigt bei höheren Konzentrationen nur wenig.

Bei den drei Experimenten mit Mikrosomen nicht-behandelter Ratten wurde nur in einem Fall die exogene H_2O_2 -Bildung gehemmt. Dieses Experiment wird in Abbildung 14 gezeigt. Die maximale Wirkung von Metyrapon ist bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ M erreicht. In den beiden anderen Versuchen war die substratinduzierte Wasserstoffperoxidbildung sehr gering und zeigte trotz hoher Hemmstoffkonzentrationen nur geringfügige Schwankungen um den Kontrollwert.

In der normierten Darstellung (Abb. 15) ist ersichtlich, daß bereits eine 1-tägige PB-Behandlung die Hemmbarkeit deutlich steigert. Die I_{50} -Werte bei Phenobarbital-behandelten Ratten sind etwas niedriger als bei Meerschweinchen (s. Tab. 4). Anders als beim Meerschweinchen wird die Hexobarbital-stimulierte H_2O_2 -Bildung bei Kontrollratten durch Metyrapon nur geringfügig gehemmt.

Der größte Unterschied zwischen beiden Tierspezies liegt demnach in der Tatsache, daß bei Ratten die Behandlung mit

Phenobarbital zu einer größeren Empfindlichkeit der substratinduzierten H_2O_2 -Bildung für Metyrapon führt, während für Meerschweinchen das Umgekehrte gilt. Bei unbehandelten Ratten ließ sich mit der verwendeten Inhibitor-konzentration eine Hemmung um 50 % nicht erreichen. Eine Metyraponkonzentration von 10^{-4} M, die die Wasserstoffperoxidbildung bei 3 Tage behandelten Tieren auf ca. 12 % des Ausgangswertes hemmt, führt bei unbehandelten Ratten noch zu einer H_2O_2 -Bildung, die etwa 80 % der ungehemmten Reaktion beträgt (s. Abb. 10 und 15).

Vorbehandlung (Tage PB)	Meerschweinchen		Ratten	
	n	I_{50} (μM)	n	I_{50} (μM)
0	5	2,8 S.D. = 1,5	3	> 100
1	2	3,9	1	2,1
2	1	6,6	1	2,6
3	2	5,1	2	5,6
4			1	3,8
5	1	10,7		
8	1	7,4		

Tab. 4: I_{50} -Werte für die Hemmung der Hexobarbital-stimulierten H_2O_2 -Bildung bei Versuchen an Ratten und Meerschweinchen und unterschiedlicher Vorbehandlungszeit mit Phenobarbital.
Hexobarbitalkonzentration 1 mM.

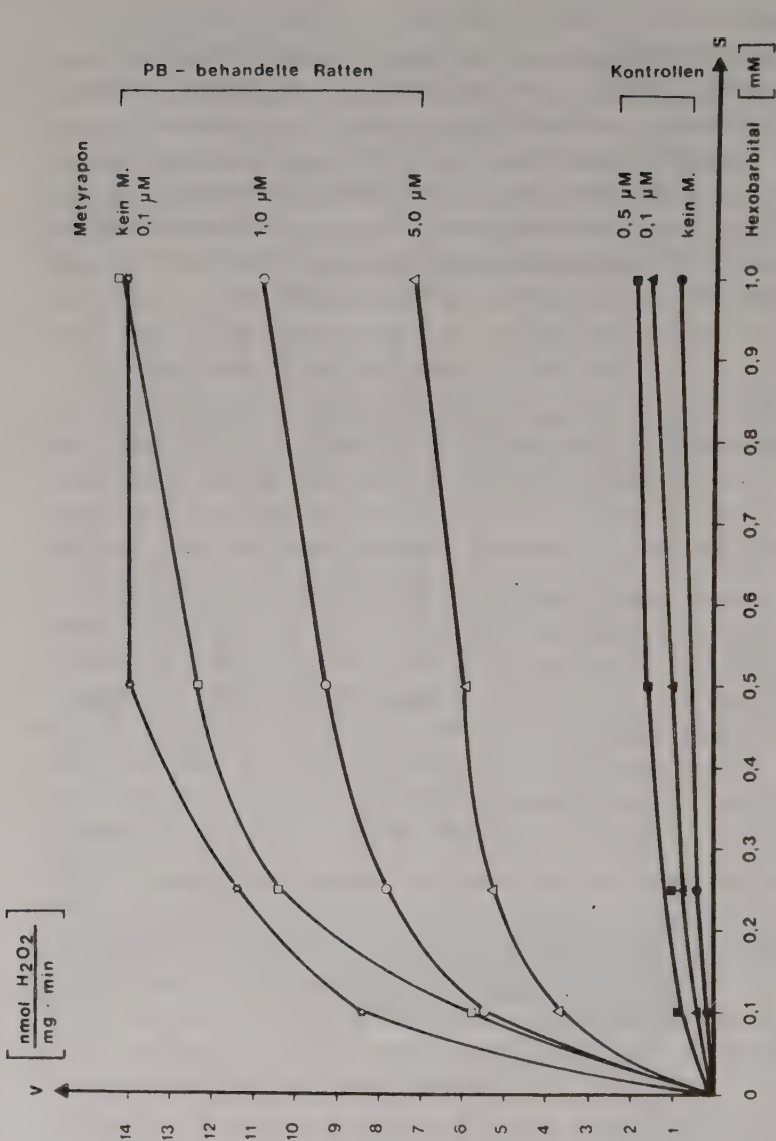


Abb. 11: Wirkung unterschiedlicher Metyraponkonzentrationen auf die Substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung bei PB-Ratten bzw. Kontrollen. Bei Kontrollen war die Wasserstoffperoxidbildung bei Metyraponkonzentrationen $> 1 \mu$ M so gering, daß sie nicht mehr exakt gemessen werden konnte.

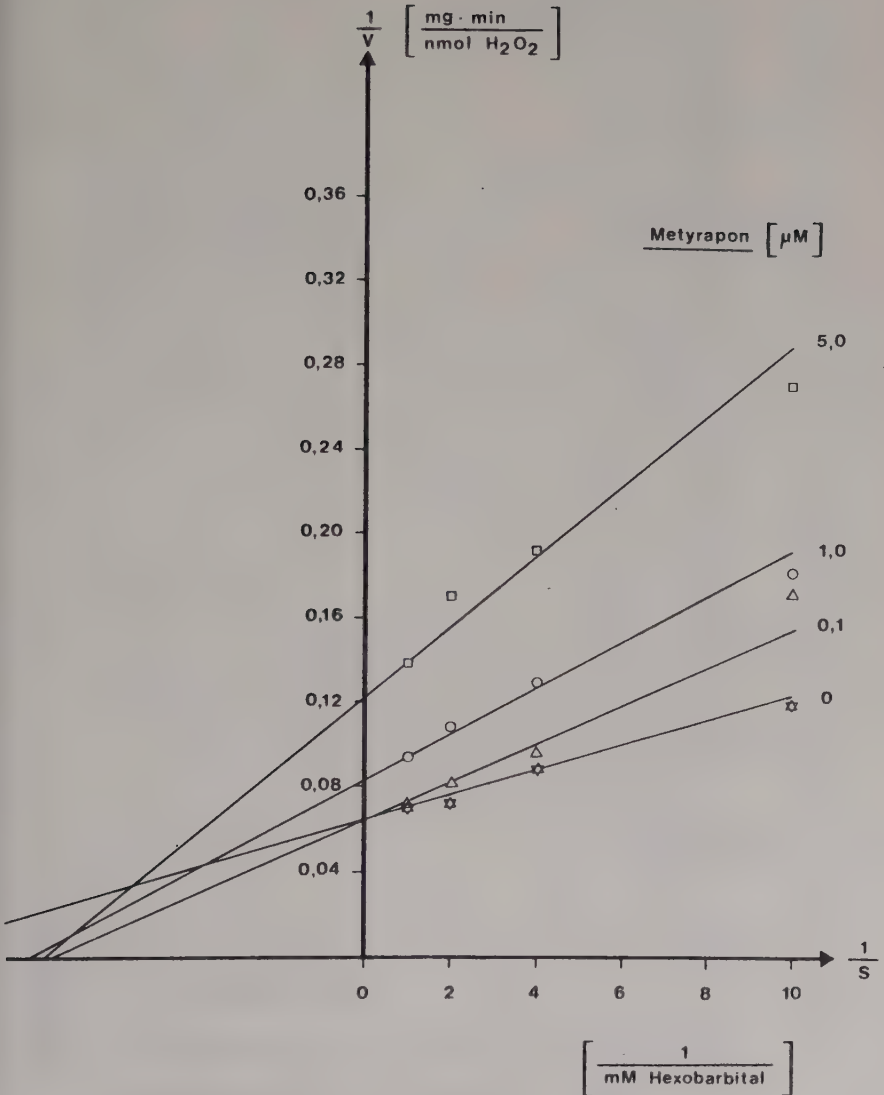


Abb. 12: Darstellung der durch Hexobarbital induzierten H_2O_2 -Bildung unter dem Einfluß von Metyrapon bei PB-Ratten.

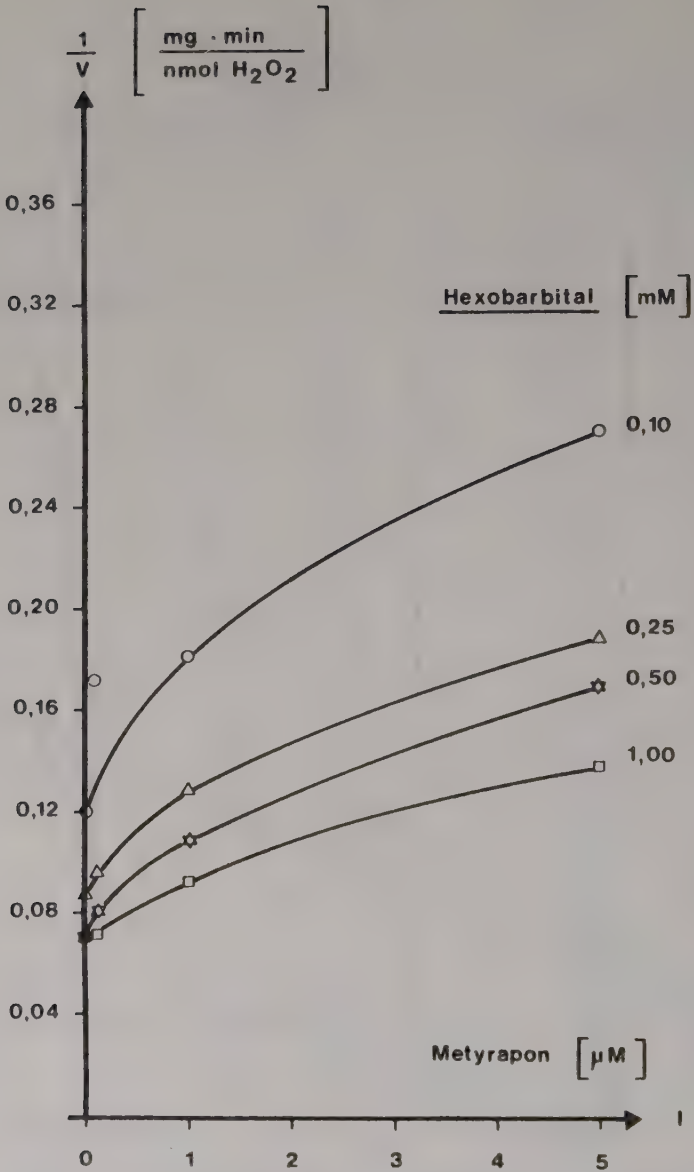


Abb. 13: Dixon-Diagramm der durch Hexobarbital induzierten H_2O_2 -Bildung unter dem Einfluß von Metyrapon bei PB-Ratten.

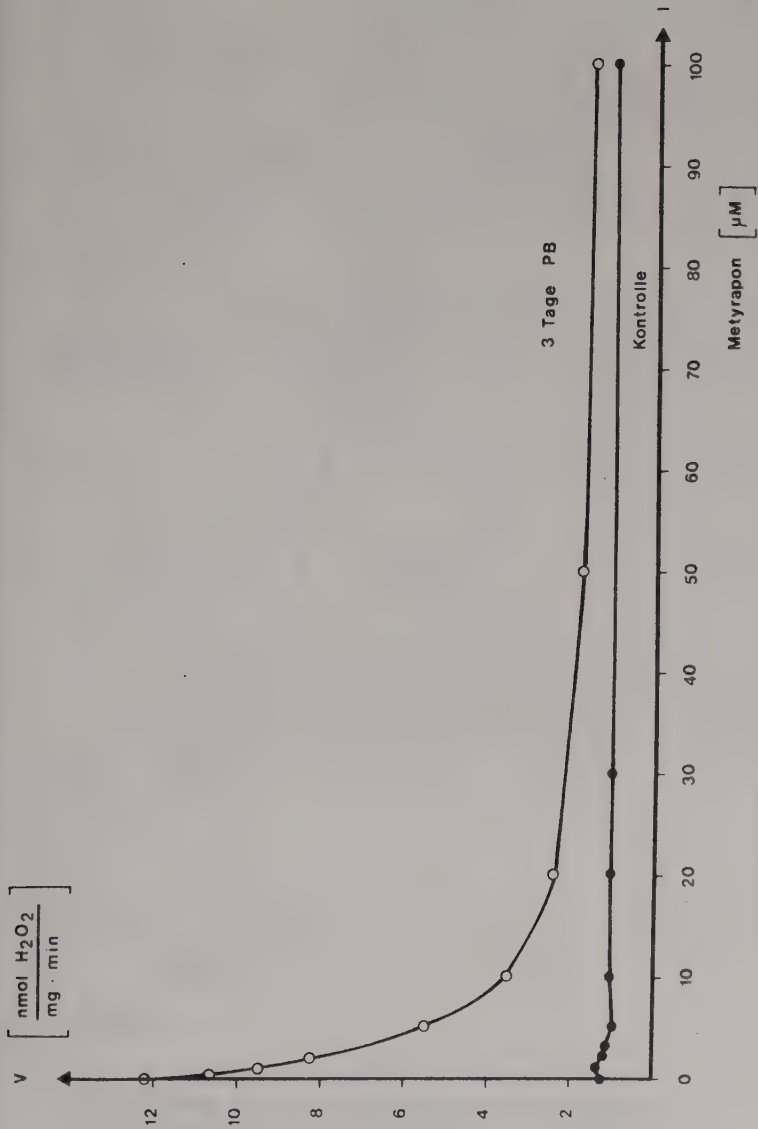


Abb. 14: Einfluß von Metyrapon auf die Substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung bei Kontrollen und bei PB-Ratten. Hexobarbitalkonzentration 1 mM. Kontrolle n = 1, PB n = 3.

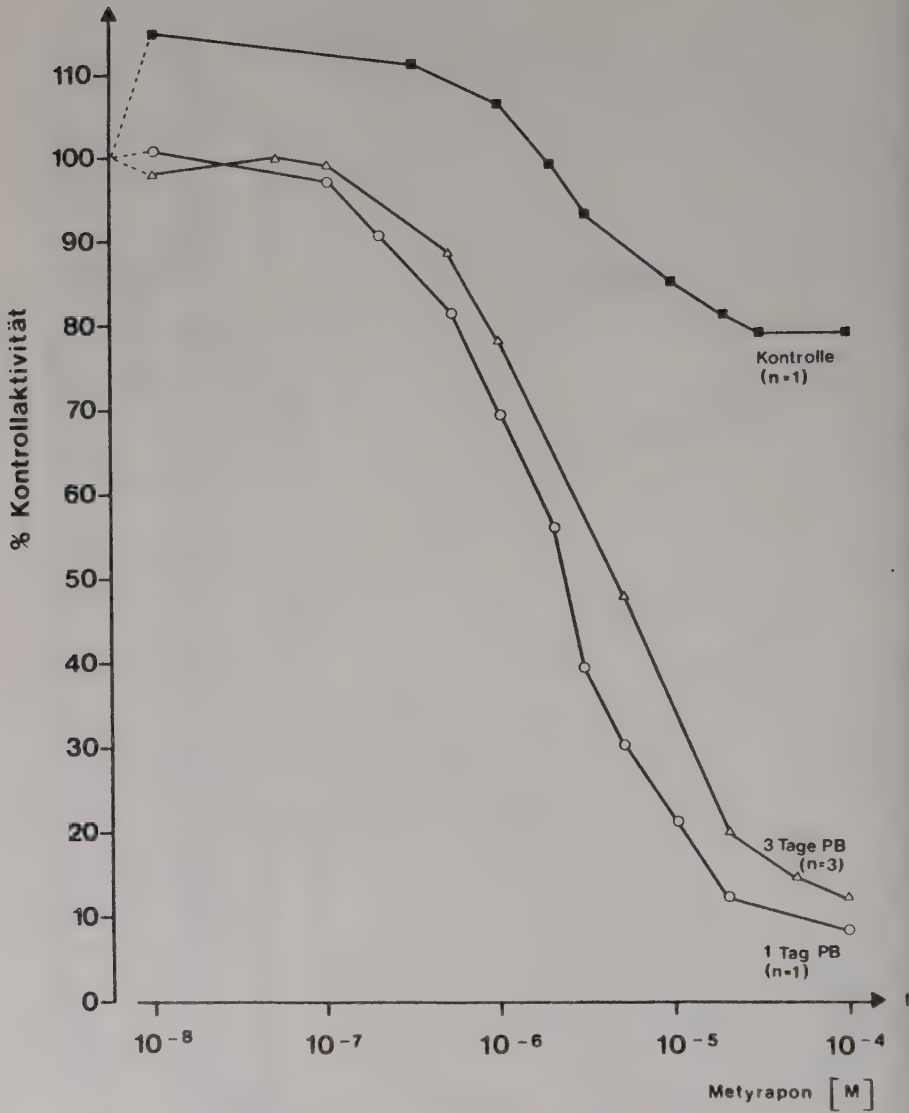


Abb. 15: Einfluß der Vorbehandlungszeit auf die Hemmbarkeit der Hexobarbital-abhängigen H_2O_2 -Bildung durch Metirapon bei der Ratte.

3.4. Bindungsspektren

Hexobarbital ruft bei seiner Bindung an Cytochrom P-450 ein Typ-I-Spektrum hervor. Die Extinktionsänderung ΔE , die dabei mit einer Konzentration von 1 mM erreicht wird, ist nahezu maximal (39). Die Induktion mit Phenobarbital ruft beim Meerschweinchen eine Steigerung der spektralen Veränderungen um ca. 66 % hervor. Bei der Ratte dagegen steigt der entsprechende Wert auf das 5-fache (Tab. 5).

Vorbehandlung	Meerschweinchen		Ratten	
	n	$\Delta E/\text{mg Protein}$	n	$\Delta E/\text{mg Protein}$
-	3	0,031 S.D. = 0,003	3	0,021 S.D. = 0,005
PB	4	0,051 S.D. = 0,009	3	0,103 S.D. = 0,006

Tab. 5: Wirkung einer 3-tägigen Vorbehandlung von Ratten und Meerschweinchen mit Phenobarbital auf die Bindungsspektren von 1 mM Hexobarbital. Eine Prüfung der Werte von Kontrollen und PB-Tieren auf Signifikanz ergab $p < 0,05$.

3.5. Wirkung von Metyrapon auf das Hexobarbital-Bindungs- spektrum

a) Meerschweinchen

Abbildung 16 zeigt, wie sich das Bindungsspektrum von Hexobarbital mit Cytochrom P-450 bei einer schrittweisen Konzentrationserhöhung von Metyrapon ändert. Es handelt sich hier um ein Experiment mit vorbehandelten Tieren.

Trägt man diese Extinktionsänderung gegen die Hemmstoffkonzentration auf, so entsteht eine Kurve, wie sie Abbildung 17 für ein Experiment mit unbehandelten und mit PB-Meerschweinchen zeigt. Wie schon bei der H_2O_2 -Bildung fällt auch bei der Hexobarbitalbindung eine starke Empfindlichkeit im niedrigen Konzentrationsbereich bis zu $2\ \mu M$ Metyrapon auf. Darauf folgt dann eine Phase mit nur noch geringer Inhibitorwirkung.

Normiert man die bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration gemessenen Werte auf die Extinktion ohne Metyrapon, erhält man Abbildung 18. Sie zeigt, daß die Bindung von Hexobarbital bereits bei Hemmstoffkonzentrationen um $2\ \mu M$ zu 50 % gehemmt ist. Der Kurvenverlauf ist für PB-Tiere und nichtbehandelte Meerschweinchen weitgehend gleich.

In Tabelle 6 sind die Metyraponkonzentrationen, die eine Hemmung auf 50 % des Ausgangswertes verursachen, nach der Länge der Vorbehandlungszeit getrennt wiedergegeben. Die darin enthaltenen Werte wurden aus Kurven wie Abbildung 18 ermittelt. Nach diesen Daten scheint kein wesentlicher Unterschied zwischen den I_{50} -Werten bei behandelten und nicht-behandelten Meerschweinchen zu bestehen.

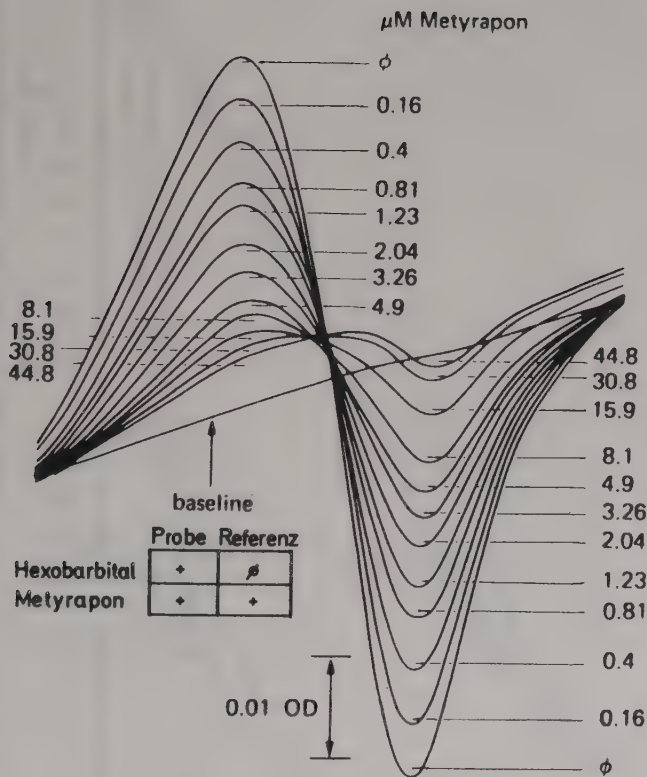


Abb. 16: Reduktion des Bindungsspektrums von Cytochrom P-450 mit Hexobarbital bei steigender Metyraponkonzentration.
 Hexobarbitalkonzentration 1 mM
 Experiment mit PB-Meerschweinchen-Mikrosomen (1,5 mg Protein/ml).

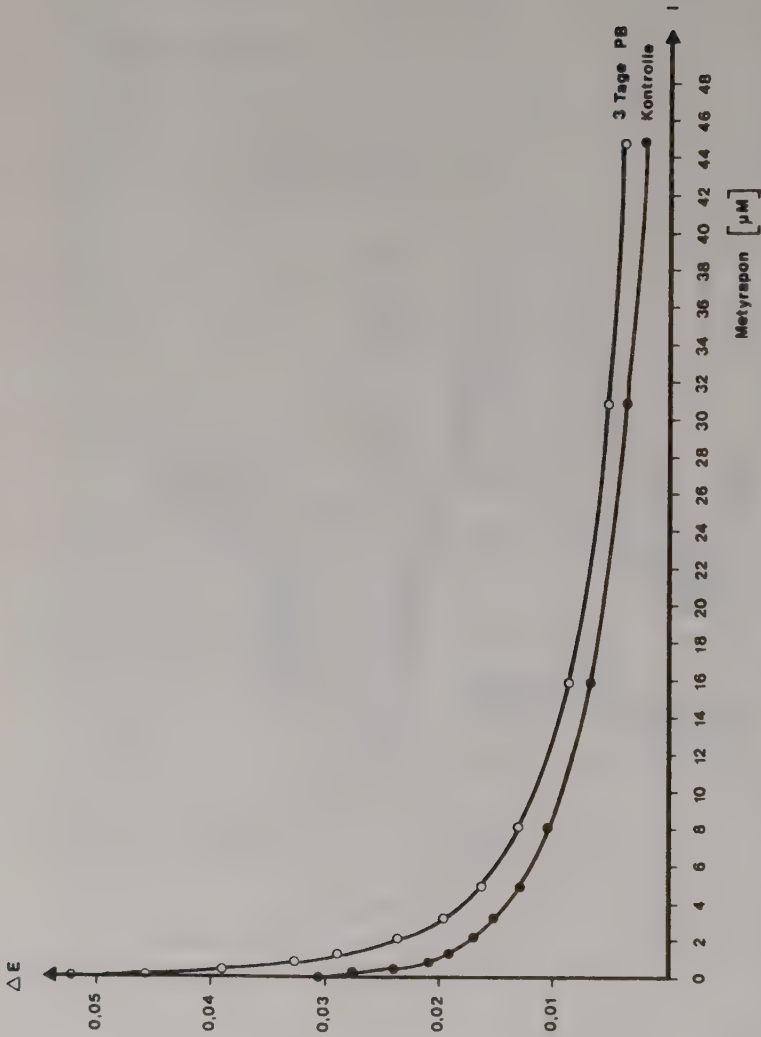


Abb. 17: Einwirkung von Metyrapon auf die Größe des Bindungsspektrums von Cytochrom P-450 mit Hexobarbital bei unbehandelten bzw. PB-Meerschweinchen ($n = 1$).
Hexobarbitalkonzentration 1 mM

% ΔE ungehemmt

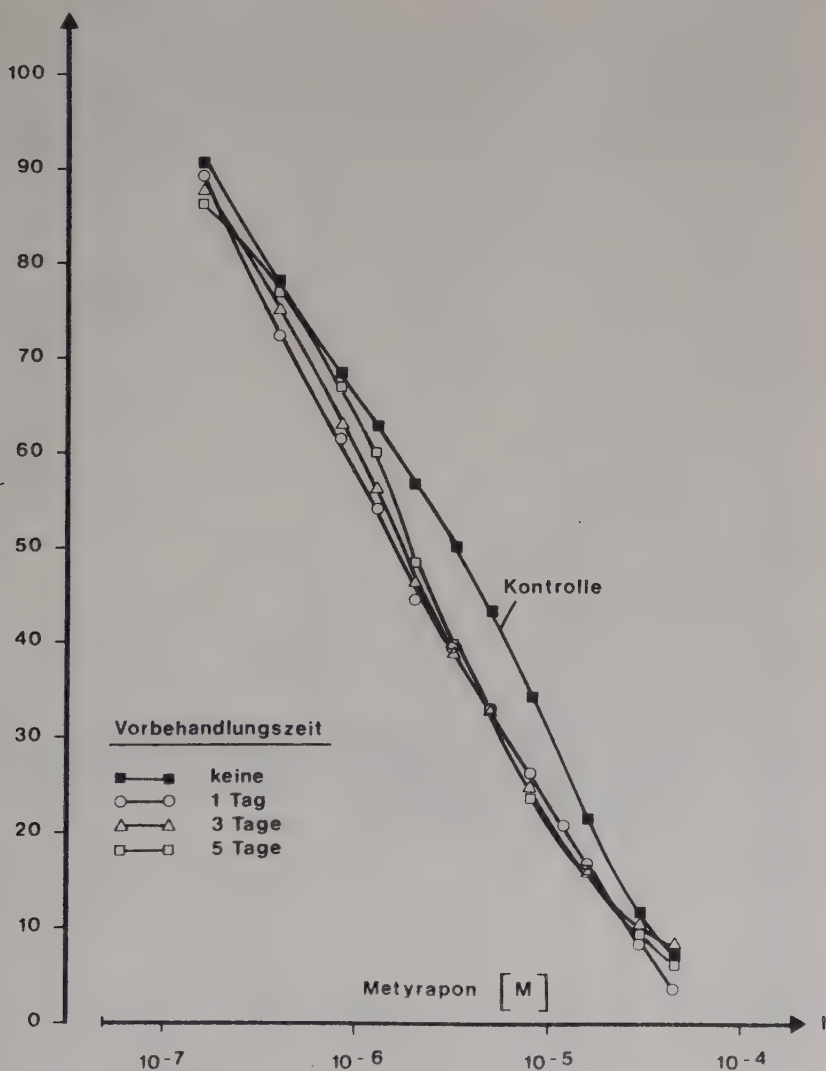


Abb. 18: Wirkung von Metyrapon auf das Hexobarbital-Bindungs-spektrum bei unterschiedlich lange vorbehandelten Meerschweinchen ($n = 1$). Die Extinktionsänderung wurde auf den Wert ohne Metyrapon normiert. Hexo-barbitalkonzentration 1 mM.

Vorbehandlung	Meerschweinchen		Ratten	
(Tage PB)	n	I ₅₀ (μM)	n	I ₅₀ (μM)
0	3	2,2 S.D. = 1,0	3	> 100
1	2	1,9	1	2,0
2	1	1,1	1	2,7
3	1	1,7	1	2,5
4			1	2,6
5	1	1,9		
8	1	2,0		

Tab. 6: I₅₀-Werte für die Hemmung des Hexobarbital-Bindungsspektrums durch Metyrapon bei unterschiedlich lange mit Phenobarbital vorbehandelten Meerschweinchen und Ratten.
Hexobarbitalkonzentration 1 mM

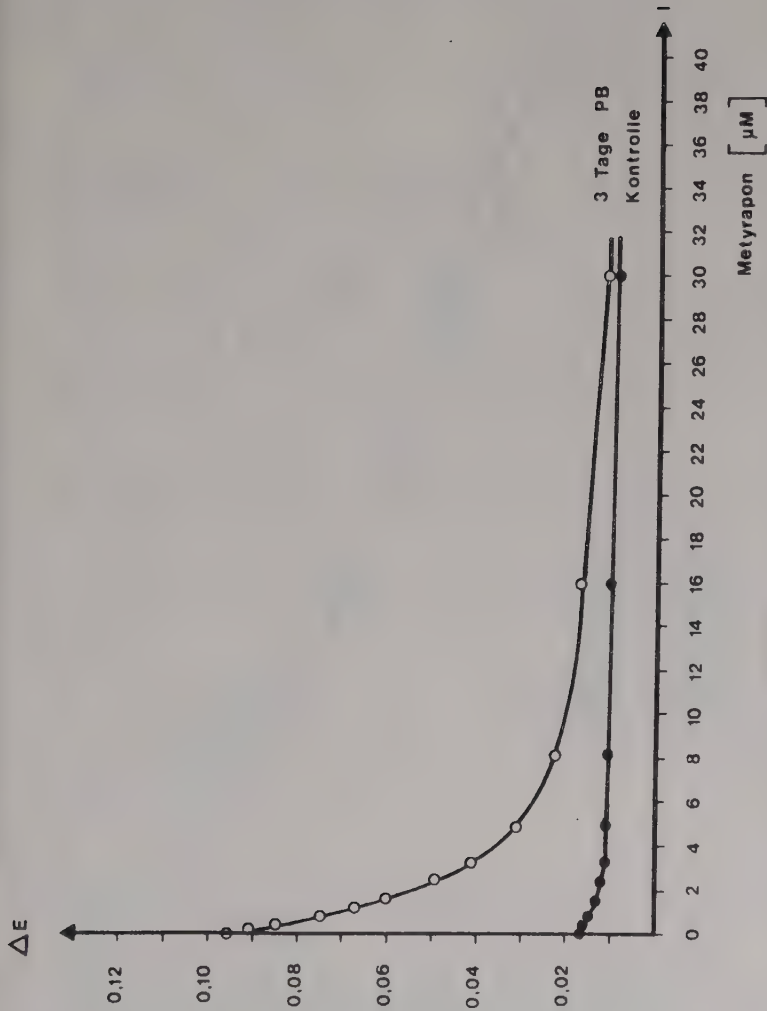


Abb. 19: Einwirkung von Metyrapon auf die Größe des Bindungsspektrums von Cytochrom P-450 mit Hexobarbital bei unbehandelten bzw. PB-Ratten ($n = 1$). Hexobarbitalkonzentration 1 mM.

% ΔE ungehemmt

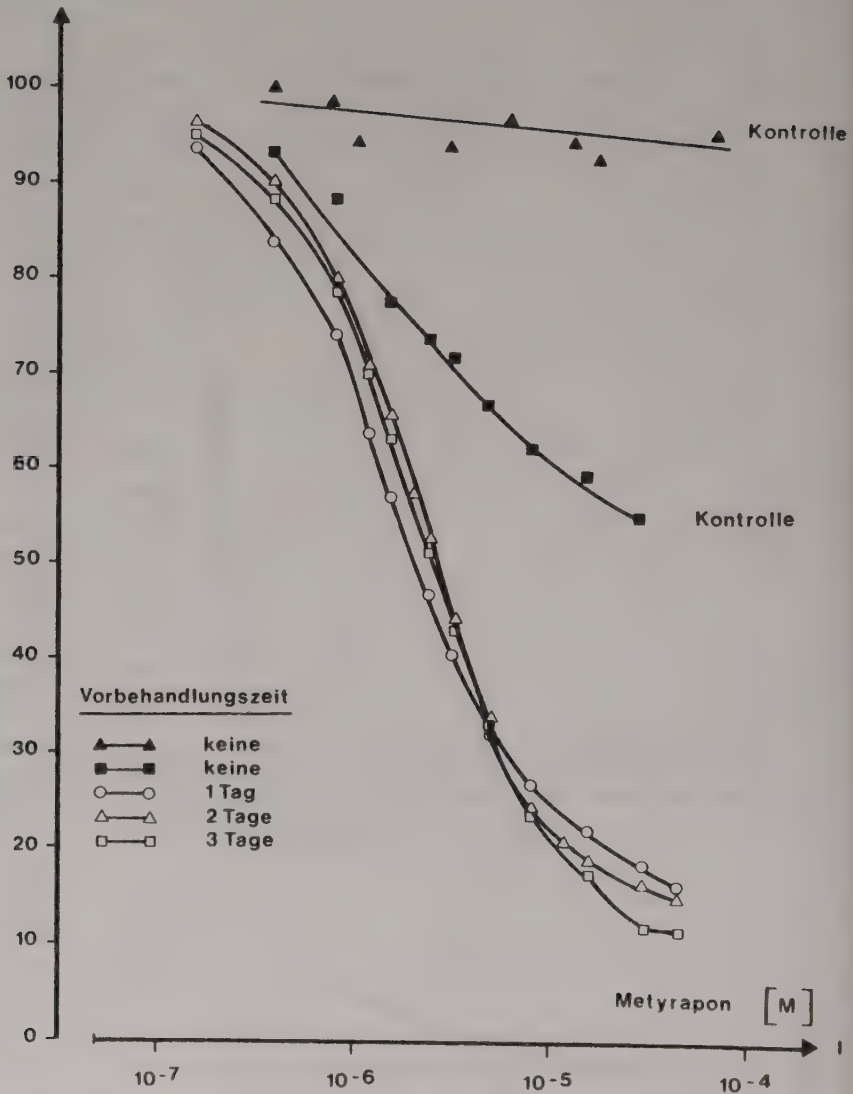


Abb. 20: Wirkung von Metyrapon auf die Größe des Hexobarbital-Bindungsspektrums bei unterschiedlich lange vorbehandelten Ratten ($n = 1$) und Kontrollen ($n = 2$ für die obere, $n = 1$ für die untere Kurve). Die Extinktionsänderung wurde auf den Wert ohne Metyrapon normiert. Hexobarbitalkonzentration 1 mM.

b) Ratten

Die starke Empfindlichkeit der Hexobarbitalbindung schon für niedrige Metyraponkonzentrationen kann auch bei der Ratte beobachtet werden. Abbildung 19 zeigt ein Experiment an PB-Tieren und unbehandelten Ratten, bei denen der deutlichste Effekt bereits mit Hemmstoffkonzentrationen unter $3 \cdot 10^{-6}$ M auftrat.

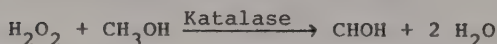
Beim Vergleich der Kurven von Tieren unterschiedlicher Vorbehandlungszeit mit der unbehandelten Ratte in normierter Darstellung zeigt sich deutlich, daß die Hexobarbitalbindung bei PB-Tieren für Metyrapon empfindlicher ist (Abb. 20). Die Länge der Vorbehandlungszeit scheint unbedeutend zu sein, denn die Kurven aus Experimenten mit behandelten Tieren liegen dicht beieinander. Nur der Kurvenverlauf nicht-behandelter Ratten setzt sich deutlich davon ab. Hervorzuheben ist, daß es sich bei dem dargestellten Experiment mit Kontrolltieren um den einzigen Versuch handelt, bei dem die Bindung von Hexobarbital an Cytochrom P-450 in diesem Ausmaß durch Metyrapon gehemmt werden konnte. Bei den beiden anderen Versuchen an unbehandelten Tieren trat entweder kein Effekt oder nur eine geringfügige Hemmung um ca. 10 % mit den benutzten Inhibitorkonzentrationen auf.

Die I_{50} -Werte, die aus diesen Darstellungen abgelesen wurden, finden sich in Tabelle 6. Bei unbehandelten Tieren konnte keine 50 %ige Hemmung der Hexobarbitalbindung hervorgerufen werden.

4. DISKUSSION

4.1. Eignung der angewandten Methoden

Bei der hier eingesetzten Methode handelt es sich um einen indirekten Nachweis von Wasserstoffperoxid. Dieses wird in der Anwesenheit von Katalase im Überschuß mit Methanol zu Formaldehyd umgesetzt, das dann mit dem sogenannten Nash-Reagenz nachgewiesen werden kann:



Eine Möglichkeit des direkten Nachweises von Wasserstoffperoxid bietet die Rhodanid-Methode (46, 100). Sie beruht auf der Fähigkeit von H_2O_2 , Fe^{2+} zu Fe^{3+} zu oxidieren, das dann als $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ photometrisch gemessen werden kann. Da die in der Mikrosomenlösung vorhandene Katalase das entstehende H_2O_2 zerstören und dem Nachweis damit entziehen würde, muß sie durch Natriumazid inaktiviert werden.

Dies ist auch bei der Scopoletin-Methode notwendig (2, 44). In Anwesenheit von H_2O_2 reagiert eine Peroxidase mit Scopoletin. Folge dieser Reaktion ist ein Verlust an Fluoreszenz, der zur Konzentration von Wasserstoffperoxid proportional ist.

Die Ergebnisse können, je nach Methode, variieren. Während die direkten Methoden nur das Wasserstoffperoxid messen, das bei der Umsetzung eines Substrates entsteht, wird beim indirekten Nachweis auch Formaldehyd erfaßt, welches z.B. bei der N-Demethylierung von Arzneimitteln gebildet werden kann. Um diese Meßungenauigkeit auszuschalten, gäbe es die Möglichkeit, C^{14} -markiertes Methanol zu verwenden. Eine Messung des markierten Formaldehyds käme dann einer direkten Bestimmung gleich. Dies erschien hier nicht notwendig.

Von Hexobarbital ist bekannt, daß es zum größten Teil in

3-Hydroxyhexobarbital und 3-Ketohexobarbital ($18 \pm 4\%$ und $58 \pm 15\%$ bei der Ratte; 13, 81, 101) umgewandelt wird. Die N-Demethylierung spielt bei der Verstoffwechselung nur eine untergeordnete Rolle (33) und ist erst bei höheren Substratkonzentrationen meßbar. Bei der höchsten hier verwendeten Hexobarbitalkonzentration (2,5 mM) beträgt das durch N-Demethylierung entstehende Formaldehyd bei PB-Ratten 0,81 Nanomol/mg min, bei PB-Meerschweinchen sind es 0,34 Nanomol/mg min. Demgegenüber ist die Formaldehydbildung durch Wasserstoffperoxidproduktion 9,4 Nanomol/mg min bzw. 30,3 Nanomol/mg min (38). In Anbetracht des Aufwandes schien es deshalb nicht nötig, bei Hexobarbital mit markiertem Methanol zu arbeiten. Der Leerwert ohne Methanol, Katalase und Hexobarbital steigt während der Inkubation kaum meßbar an und kann deshalb vernachlässigt werden.

Dem Nachteil einer geringeren Spezifität durch anderweitig anfallendes Formaldehyd fällt als Vorteil der Methanol/Katalase-Methode ins Gewicht, daß entstehendes Wasserstoffperoxid sofort aus der Inkubationslösung entfernt wird, während es bei der direkten Methode unter Umständen kumuliert. Bei kurzen Inkubationszeiten kommen beide Methoden zu den gleichen Ergebnissen. Steigt dann die H_2O_2 -Konzentration weiter an, kann Cytochrom P-450 bei bestimmten Substraten als Peroxidase wirken, was dann zu einer niedrigeren Messung bei der direkten Methode führt (44, 46, 100). Es wäre dann vorstellbar, daß Methanol auch in Abwesenheit von Katalase unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid zu Formaldehyd oxidiert wird. Diese Vermutung konnte durch Versuche mit sehr hohen H_2O_2 -Konzentrationen ausgeschlossen werden (103).

Das Wasserstoffperoxid, das durch eine dieser Methoden gemessen wird, setzt sich aus zwei Fraktionen zusammen:

1) endogenes H_2O_2

entsteht in Abwesenheit eines zugefügten Substrates.

Als Erklärung für die Entstehung wird die Verstoffwechslung einer in der Zelle bzw. in Mikrosomen vorhandenen Substanz diskutiert (23, 26).

2) Substrat-stimuliertes H_2O_2

ist das darüber hinaus entstehende Wasserstoffperoxid nach Zugabe eines Substrates.

Um den Wert für die Substrat-abhängige H_2O_2 -Bildung zu erhalten, muß man demnach vom gemessenen Wert die endogene Aktivität abziehen. Ein solches Vorgehen ist nicht ganz unproblematisch, da man über das Verhalten der endogenen Wasserstoffperoxidbildung in Anwesenheit eines Substrates nicht viel weiß. Es ist nicht sicher, ob während der Umsetzung einer zugeführten Substanz noch eine endogene H_2O_2 -Bildung stattfindet (23, 37, 52, 98).

4.2. Beeinflussung der endogenen H_2O_2 -Bildung durch Metyrapon

Die endogene Wasserstoffperoxidbildung wird beim Meerschweinchen durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital auf den mehr als doppelten Wert stimuliert. Bei der Ratte liegt die endogene H_2O_2 -Bildung um ca. 200 % über der des Meerschweinchens. Nach der Behandlung mit Phenobarbital erreicht die Aktivität den etwa 2-fachen Wert vor Induktion (s. Tab. 1).

Ein Vergleich mit Werten aus der Literatur von Autoren, die mit der gleichen Methode gearbeitet haben, zeigt meist eine gute Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Werten (s. Tab. 7). Der Unterschied bei Kontroll-Meerschweinchen könnte an der unterschiedlichen Herkunft der

Tiere liegen.

Phenobarbital ist von den bislang untersuchten Substanzen für das Meerschweinchen einer der wirksamsten Induktoren. Die Wirkung von 3-Methylcholanthren auf die endogene H_2O_2 -Bildung ist nur halb so stark. Bei Behandlung mit Pregnenolon-16 α -carbonitril (PCN) fällt die Wasserstoffperoxidbildung sogar um ca. 40 % ab (100).

Auch für die Ratte ist eine Behandlung mit Phenobarbital etwa doppelt so wirksam wie mit 3-Methylcholanthren. PCN hat aber bei dieser Tierspezies einen ähnlich starken Effekt wie Phenobarbital (43).

Eine eindeutige Wirkung von Metyrapon auf die endogene Wasserstoffperoxidbildung ist beim Meerschweinchen nicht zu erkennen. Hemmung, Stimulierung oder keine meßbaren Veränderungen scheinen gleichermaßen möglich zu sein. Ohne Wirkung auf die endogene H_2O_2 -Bildung bleibt Metyrapon hauptsächlich bei unbehandelten oder nur kurzzeitig behandelten Tieren. Eine Stimulierung der endogenen Oxidasetätigkeit um bis zu 50 % wurde bei Tieren beobachtet, deren endogene Wasserstoffperoxidbildung gering war. Dieser Effekt ist unabhängig von der Vorbehandlungszeit und tritt auch bei Tieren auf, die nicht behandelt wurden. Damit stimmen Beobachtungen an Lungenmikrosomen von Kaninchen überein, an denen Metyrapon stets zu einer erheblichen Stimulierung der endogenen H_2O_2 -Bildung führt (Roots et al., unveröffentlichte Beobachtung). Beträgt die endogene H_2O_2 -Bildung um 5 Nanomol/mg min und darüber, ist in den meisten Fällen mit einer Hemmung durch Metyrapon zu rechnen, die im Höchstfall 32 % erreichte (s. Abb. 3). Weitere Experimente müssen zeigen, unter welchen Bedingungen Metyrapon aktivierend oder hemmend wirkt.

Die endogene Oxidaseaktivität wird bei der Ratte durch Metyrapon gehemmt. Diese Inhibitorwirkung scheint umso stärker zu sein, je höher die Wasserstoffperoxidbildung ist.

Bei den Tieren mit der höchsten endogenen Aktivität konnte so eine Hemmung auf 54 % des Ausgangswertes erzielt werden (s. Abb. 4).

Charakteristisch für die endogene H_2O_2 -Bildung der Ratte im Vergleich zum Meerschweinchen ist damit:

- 1) die mehr als doppelt so hohe Aktivität bei nicht-behandelten und PB-Tieren.
- 2) die Hemmwirkung von Metyrapon.

Versuchstier	endogene H ₂ O ₂ -Bildung [Nanomol/mg min]				Autor
	Kontrolle	PB	3-MC	PCN	
Meerschweinchen	3,9	7,05			Heinemeyer et al. (38)
	± 1,97	± 3,23			
	5,18	9,57	7,54	2,94	Tjoe (100)
	± 2,23	± 2,92	± 2,64	± 0,49	
	2,1	5,8			eigene Werte
	± 1,0	± 2,7			
Ratten	6,0	12,4			Heinemeyer et al. (38)
		± 5,28			
	9,0	16,7	12,2	18,0	Hildebrandt et al. (43)
	6,0	12,8			eigene Werte
	± 1,1	± 4,6			

Tab. 7: Übersicht über die von verschiedenen Autoren ermittelten Werte für die endogene Wasserstoffperoxidbildung bei Ratte und Meerschweinchen bei Vorbehandlung mit unterschiedlichen Substanzen.

4.3. Einfluß von Metyrapon auf die substratinduzierte H₂O₂-Bildung

Phenobarbital ist einer der wirksamsten Induktoren der 3-Hydroxylierung von Hexobarbital. Bei Ratten konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivität nach Vorbehandlung auf den mehr als 4-fachen Wert ansteigt (7). Ähnliches zeigt sich bei der durch Hexobarbital stimulierten H₂O₂-Bildung. Eine 3-tägige Behandlung führt beim Meerschweinchen zu einem Anstieg der Aktivität auf den etwa 4-fachen Wert, bei der Ratte auf das ca. 10-fache. Da die Bildung von Wasserstoffperoxid am Cytochrom P-450 erfolgt, wäre es naheliegend, die gesteigerte H₂O₂-Bildung mit der Zunahme der Cytochrom-P-450-Konzentration in Zusammenhang zu bringen. Die Tabellen 2 und 3 zeigen, daß diese Annahme nur bedingt richtig ist. Es scheint bei beiden Tierspezies keine feste Beziehung zwischen der Gesamtkonzentration an Cytochrom P-450 und der Substrat-induzierten H₂O₂-Bildung zu geben. Diese steigt eher mit der Länge der Vorbehandlung. Während die Wirkung von Metyrapon auf die endogene H₂O₂-Bildung beim Meerschweinchen nicht vorauszusehen ist, führt es bei der Substrat-induzierten Wasserstoffperoxidbildung immer zu einer Hemmung. Bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ M Metyrapon wurden nur noch 5 bis 27 % des Ausgangswertes gemessen. Die Inhibitorwirkung ist umso stärker, je höher die ungehemmte Aktivität ist.

Bei Ratten sinkt die durch Hexobarbital induzierte Oxidaseaktivität auf 6 bis 23 % des Ausgangswertes ab. Lediglich unbehandelte Tiere weisen eine geringere Hemmbarkeit auf rund 80 % der ungehemmten Reaktion auf (s. Abb. 10 bzw. 15).

Die Behandlung mit Phenobarbital führt bei der Ratte, in geringerem Ausmaß auch beim Meerschweinchen, zu einer größeren Empfindlichkeit für Metyrapon. Eine Erklärung hierfür bieten Experimente an Ratten, in denen die Bindungsfähigkeit zweier Fraktionen von Cytochrom P-450 mit

den Inhibitoren SKF-525A und Metyrapon gemessen wurde (29). Es stellte sich heraus, daß Phenobarbital nur zu einer Konzentrationserhöhung der Form von Cytochrom P-450 führt, die Metyrapon bindet. Die Menge an Enzym, die gehemmt werden kann, ist demnach bei PB-Tieren größer als bei nicht-behandelten Ratten. Einen weiteren Hinweis darauf, daß Metyrapon nur mit einem Teil des zur Verfügung stehenden Cytochrom P-450 reagieren kann, zeigen Experimente an PB-Ratten, bei denen gleichzeitig die Wasserstoffperoxidbildung und die N-Demethylierung von Äthylmorphin gemessen wurde (22). Während sich die H_2O_2 -Produktion nur um ca. 50 % hemmen ließ, sank der Metabolismus von Äthylmorphin um mehr als 90 % ab. Die Autoren erklären dieses Resultat damit, daß nur 50 % des Cytochrom P-450 mit Metyrapon reagieren und nur dieser Anteil Äthylmorphin verstoffwechselt. An der Wasserstoffperoxidbildung dagegen ist das gesamte Cytochrom P-450 beteiligt.

Inzwischen ist die spektrale Dissoziationskonstante K_s des Cytochrom-P-450-Metyrapon-Komplexes für die durch Phenobarbital induzierbare Cytochrom-P-450-Fraktion mit $0,6 \mu M$ bestimmt worden (70). Andere Isoenzyme haben einen K_s -Wert von $80 \mu M$ (70). Mit gereinigtem Isoenzym wurde der molare Extinktionskoeffizient des Metyrapon-Cytochrom-P-450-Komplexes ermittelt. Darüber hinaus ist ein Verfahren entwickelt worden, mit Hilfe der spektralen Änderungen das durch Phenobarbital induzierte Enzym zu quantifizieren (67, 70). Da Metyrapon nicht an alle Cytochrom-P-450-Fractionen bindet, kann es zu keiner vollständigen Unterdrückung der H_2O_2 -Bildung kommen (22). Unabhängig von der Höhe der Substrat-induzierten Wasserstoffperoxidbildung ohne Hemmstoff bleibt beim Meerschweinchen eine Restaktivität von $0,7$ bis $1,7$ Nanomol/mg min, für Ratten beträgt sie noch $0,7$ bis $2,1$ Nanomol/mg min.

In besonderen Fällen kann sich das Verhalten gegenüber dem Inhibitor durch Induktion sogar umkehren. Bei der Trichlor-äthylenoxidation durch Mikrosomen von PB-Ratten konnte

eine Hemmung der Reaktion durch Metyraponkonzentrationen über 10^{-6} M gezeigt werden. Nichtbehandelte Tiere zeigten dagegen eine Stimulierung mit Höchstwerten bei 10^{-3} M. Eine Hemmung trat erst ab Konzentrationen über 10^{-2} M auf (59). Die Wirkung, die Metyrapon hervorruft, ist nicht in allen Konzentrationsbereichen einheitlich und vom verwendeten Substrat abhängig. Bei der N-Demethylierung von Amidopyrin und Äthylmorphin ist die Hemmung bei nanomolaren Inhibitor-konzentrationen nichtkompetitiv. In höheren Konzentrationsbereichen tritt eine eher kompetitive Hemmung auf. Beides zeigt sich an unbehandelten und an PB-Ratten (85, 86). Die N-Demethylierung von N-Monomethyl-p-nitroanilin und die O-Demethylierung von p-Nitroanisol in Mikrosomen von Mäusen werden von Metyrapon in Konzentrationen von 1 bis $2 \cdot 10^{-4}$ M kompetitiv gehemmt (75).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente an Meer-schweinchen deuten für die Metyraponkonzentrationen von 10^{-5} bis $5 \cdot 10^{-6}$ M auf einen gemischten Hemmtyp hin. Es könnte sich dabei, wie bei der N-Demethylierung von Amido-pyrim und Äthylmorphin, um eine nichtkompetitive Hemmung im nanomolaren Bereich handeln, die später in eine kompetitive Hemmung übergeht.

4.4. Angriffspunkt von Metyrapon

Metyrapon wird an reduziertes und an oxidiertes Cytochrom P-450 gebunden (12, 41, 42). Seine Metaboliten sind reduziertes Metyrapon und zwei N-Oxide. Reduziertes Metyrapon ist ebenfalls als Inhibitor wirksam, wenn auch etwas schwächer (75). Die Bildung von N-Oxiden ist bei PB-Tieren ausgeprägter (15). Im Gegensatz zu CO, das alle Reaktionen von Cytochrom P-450 hemmt, beeinflusst Metyrapon nur bestimmte Vorgänge. Es kann auch zu einer Stimulierung füh-

ren, wie z.B. bei der Hydroxylierung von Acetanilid (59, 60). Aufgrund der Tatsache, daß Typ-I- und Typ-II-Substrate unterschiedliche Bindungsspektren mit Cytochrom P-450 hervorrufen, ist die Vermutung geäußert worden, daß sie an verschiedenen Stellen gebunden werden. So ist von Netter ein Modell für Cytochrom P-450 vorgeschlagen worden, das zwei Bindungsstellen hat (75). An der Bindungsstelle für Typ-II-Substrate sollen CO und O₂ angreifen.

Der Hemmstoff SKF-525A wird an die Bindungsstelle für Typ-I-Substrate gebunden und dort durch oxidative Desalkylierung metabolisiert. Sein Wirkungsmechanismus scheint in der Kompetition mit anderen Typ-I-Substraten um die Bindung zu bestehen (42, 75).

Metyrapon gehört zu den Typ-II-Substraten und kann demnach mit der Typ-I-Substanz Hexobarbital nicht um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Sein Wirkungsmechanismus muß ein anderer sein als eine bloße Substratverdrängung. Dieser Angriffspunkt muß nicht unbedingt am Cytochrom P-450 zu suchen sein. So konnte gezeigt werden, daß Metyrapon, in Gegenwart eines zu hydroxylierenden Substrates in den Mitochondrien die Atmungskette hemmt (55). Da in der Mikrosomenfraktion keine Mitochondrien vorhanden sind, scheidet diese Erklärungsmöglichkeit aus. Die Reduktion von Cytochrom P-450 bleibt unbeeinflusst (41, 54, 71, 73).

Die meisten Autoren suchen daher den Angriffspunkt bei der Substrathydroxylierung an Cytochrom P-450 (42, 55), vermutlich bei der Einfügung des aktivierten Sauerstoffs (42, 73). Da Metyrapon an der gleichen Bindungsstelle wie O₂ gebunden wird, könnte zwischen beiden eine Kompetition auftreten. Dies erklärt die nicht-kompetitive Hemmung durch Metyrapon (85).

An PB-Meerschweinchen haben Heinemeyer et al. (38) für die spektrale Bindung, die Bildung von Hydroxyhexobarbital und die Substrat-induzierte H₂O₂-Bildung jeweils zwei K_m- bzw. zwei K_s-Werte erhoben. Für die Wasserstoffperoxidbildung liegt

ein Wert bei 0,0098 mM und spiegelt eine hohe Affinität zum Enzym wider, der andere deutet mit 2,43 mM eine geringere Affinität an. Die Bindung und Verstoffwechselung von Hexobarbital könnte demnach an zwei Cytochrom-P-450-Spezies erfolgen, auf die auch Metyrapon eine unterschiedliche Wirkung hat. Es wäre beispielsweise denkbar, daß ein Enzym nicht-kompetitiv, das andere kompetitiv gehemmt wird. Auch der gleiche Hemmtyp bei unterschiedlicher Affinität wäre möglich. In beiden Fällen würde daraus ein gemischter Hemmtyp resultieren.

Ein Ziel der Arbeit sollte es ursprünglich sein, die Konzentration der bei der H_2O_2 -Bildung aktiven Zentren von Cytochrom P-450 durch eine Titration mit Metyrapon zu bestimmen. Im nanomolaren Konzentrationsbereich liegt der Hemmstoff in der gleichen Größenordnung wie das Enzym vor. In diesem Falle wäre eine Bestimmung der katalytisch aktiven Zentren, des Turnover und der Inhibitorkonstanten K_i mit Hilfe der "mutual depletion system kinetics" möglich (86). Ihre Anwendung hat aber eine nicht-kompetitive Hemmung zur Voraussetzung. Eine solche Hemmform konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden.

4.5. Korrelation zwischen Wasserstoffperoxydbildung und spektralen Veränderungen

Die spektralen Veränderungen, die durch Substratzugabe in eine Mikrosomensuspension hervorgerufen werden, spiegeln die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes wider (64, 80, 84). Da dies der erste Schritt einer Reaktion ist, wäre es naheliegend, zwischen der Größe der Spektren und der Metabolisierungsrate eine Korrelation anzunehmen. Dazu liegen bisher widersprüchliche Ergebnisse vor (30, 38). Bei der Behandlung von Ratten mit Phenobarbital konnte gezeigt werden, daß sich der Gehalt an Cytochrom P-450 und

das Bindungsspektrum von Äthylmorphin in vergleichbarem Ausmaß verändern. Das Spektrum mit Anilin verändert sich dagegen weniger stark. Die Autoren stellten sowohl bei Typ-I- als auch bei Typ-II-Substraten eine Korrelation zwischen Bindungsspektren und Metabolisierungsrate fest, die sich aber nicht in einem festen Zahlenverhältnis ausdrücken läßt (39). Andere Autoren konnten bei Experimenten mit unterschiedlich vorbehandelten Ratten ebensowenig eine feste Beziehung zwischen dem Gehalt an Cytochrom P-450 und der Hydroxylierung von Anilin wie für die maximalen spektralen Veränderungen und $v_{\max}$ feststellen. Die Wirkung von Phenobarbital auf die spektrale Bindung war etwa doppelt so stark wie der Induktionseffekt auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Daraus wird der Schluß gezogen, daß durch die Phenobarbitalbehandlung die Bildung eines Cytochrom P-450 induziert wird, das an der Bindung von Anilin stärker beteiligt ist als an seiner Hydroxylierung (30).

Für Hexobarbital dagegen konnte bereits eine gute Übereinstimmung zwischen der Bildung von 3-Hydroxyhexobarbital und der spektralen Bindung bei Ratten und Meerschweinchen gezeigt werden, bei unbehandelten und bei PB-Tieren (14, 38). Auch zwischen Hexobarbital-Bindung und Substrat-induzierter H_2O_2 -Bildung wurde ein Zusammenhang bei Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen gefunden (35, 38).

Dieser Zusammenhang wird durch die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützt. Die Abbildung 21 zeigt, wie bei Meerschweinchen bzw. Ratten H_2O_2 -Bildung und Hexobarbitalbindung gemeinsam ansteigen. Eine Beziehung zur Cytochrom-P-450-Konzentration besteht dagegen nur bedingt (s. Tab. 8). Es ist zu vermuten, daß durch die Vorbehandlung eine bestimmte Cytochrom-P-450-Spezies überproportional zunimmt, die für Hexobarbital eine stärkere Bindungsfähigkeit aufweist und H_2O_2 in verstärktem Maß bildet. Berechnet man die entsprechenden Werte für Meerschweinchen bzw. Ratten pro nmol Cytochrom P-450, so zeigt sich, daß

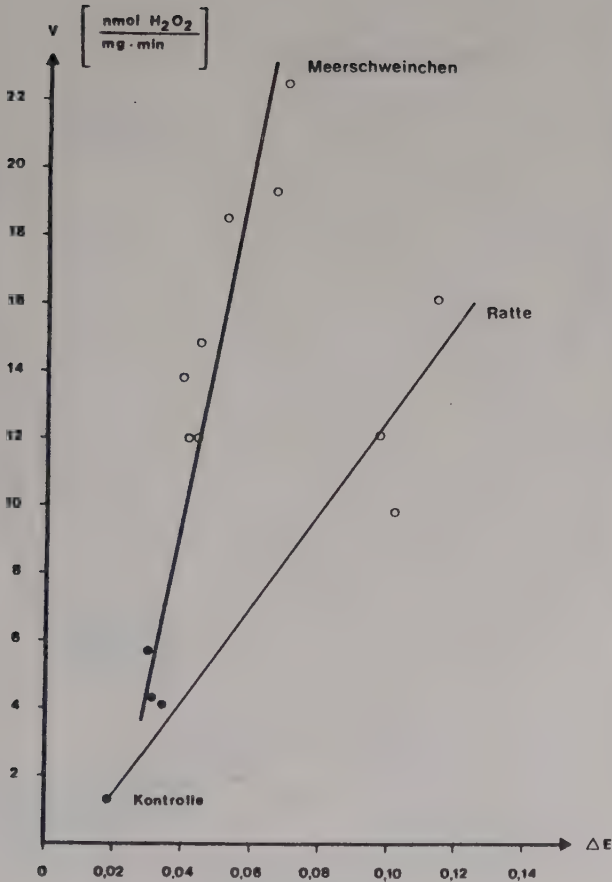


Abb. 21: Substratinduzierte H_2O_2 -Bildung und Hexobarbitalbindung bei Meerschweinchen und Ratten, die mit PB behandelt wurden oder unbehandelt blieben. Werte aus Tab. 8; Hexobarbitalkonzentration 1 mM.

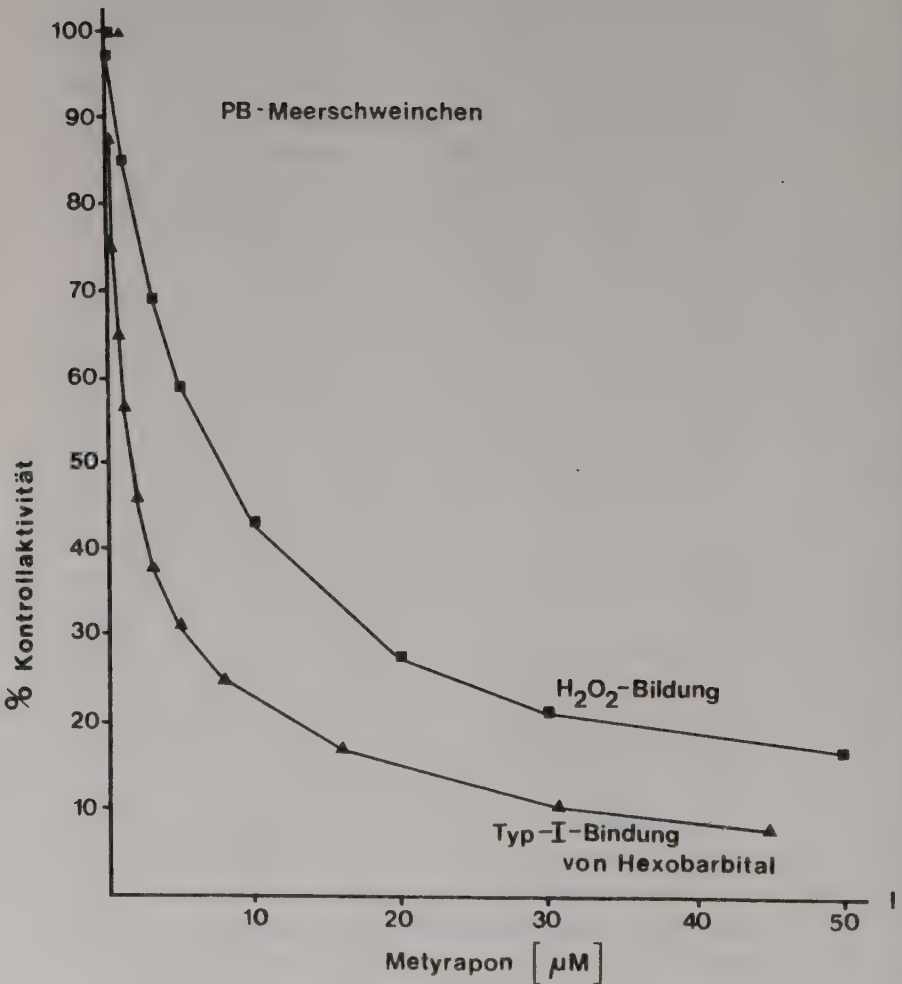


Abb. 22: Einfluß von Metyrapon auf die Hexobarbital-Bindung und Substrat-induzierte H₂O₂-Bildung bei 3 Tage mit Phenobarbital behandelten Meerschweinchen (n = 1). Hexobarbitalkonzentration 1 mM. Werte aus Abb. 9 und 17.

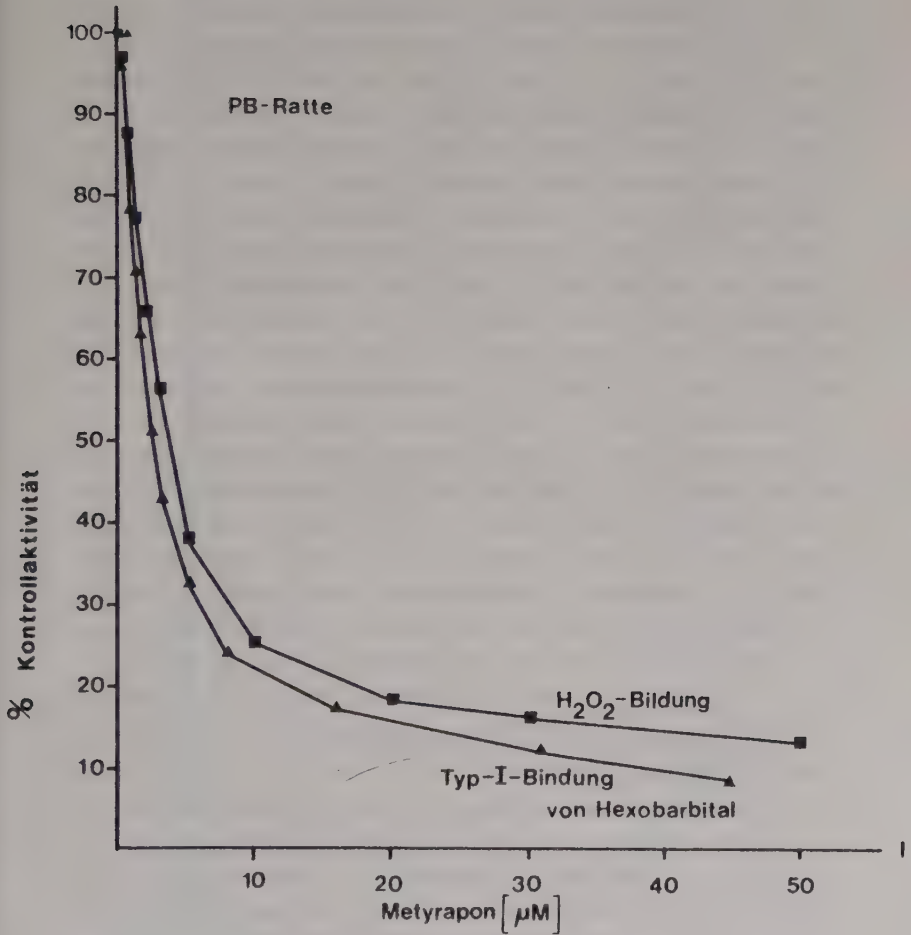


Abb. 23: Einfluß von Metyrapon auf die Hexobarbital-Bindung und die Substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung bei 3 Tage mit Phenobarbital behandelten Ratten ($n = 1$). Hexobarbitalkonzentration 1 mM. Werte aus Abb. 14 und 19.

Vorbehandlung Tage PB	Meerschweinchen			Ratten		
	n	H ₂ O ₂ -Bildung/nmol Cytochrom P-450	ΔE / nmol Cytochrom P-450	n	H ₂ O ₂ -Bildung/nmol Cytochrom P-450	ΔE / nmol Cytochrom P-450
0	3	4,8	0,032	1	1,6	0,023
1	2	7,8	0,027	1	4,1	0,032
2	1	9,1	0,026	1	3,5	0,039
3	3	11,4	0,032 (n=1)	1	5,1	0,041
4				1	6,0	0,042
5	1	10,6	0,028			
8	1	12,0	0,041			

Tab. 8: Cytochrom-P-450-Konzentration, H₂O₂-Bildung und Hexobarbitalbindung bei unterschiedlich lange vorbehandelten Meerschweinchen und Ratten. Hexobarbitalkonzentration 1 mM. Werte aus Tab. 2, 3 und 5.

die H_2O_2 -Bildung mit der Länge der Vorbehandlung bei beiden Tierspezies pro Einheit Cytochrom P-450 zunimmt. Einen Anstieg der Bindungsfähigkeit für Hexobarbital sieht man allerdings nur bei der Ratte.

Bei der Hemmung durch Metyrapon haben Bindungsspektren und Substrat-induzierte Wasserstoffperoxidbildung einen ähnlichen Kurvenverlauf (s. Abb. 22 und 23). Die dritte wesentliche Reaktion von Cytochrom P-450 mit Hexobarbital, die 3-Hydroxylierung, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Unveröffentlichte eigene Untersuchungen zeigten jedoch, daß die I_{50} -Werte für die Hemmung der 3-Hydroxyhexobarbital-Bildung durch Metyrapon bei Kontroll-Meerschweinchen etwa eine Zehnerpotenz über den I_{50} -Werten für die spektrale Bindung und die H_2O_2 -Bildung liegen. Diese interessante Diskrepanz könnte auf eine unterschiedliche Regulierung der Oxidase- und Oxygenasefunktion von Cytochrom P-450 hinweisen. Bei der Ratte sind auch die I_{50} -Werte für diese beiden Funktionen etwa gleich, während beim Meerschweinchen der Einfluß von Metyrapon auf die Bindung von Hexobarbital etwas stärker ist als auf die durch dieses Substrat induzierte H_2O_2 -Bildung. Die im Prinzip vorhandene hohe Empfindlichkeit beider Funktionen gegenüber Metyrapon sowie die weitgehende Parallelität beider Kurvenverläufe macht aber einen Zusammenhang zwischen der Bindung von Hexobarbital und der H_2O_2 -Bildung wahrscheinlich.

Die optimalen Bedingungen für die Bildung von H_2O_2 haben Hildebrandt et al. (48) unter Anwendung einer enzymkinetischen Methode mit kontinuierlicher Variation der für die Reaktion wichtigen Reaktionspartner untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß äquimolare Konzentrationen von Hexobarbital und NADPH für die Entstehung von Wasserstoffperoxid am günstigsten sind. Es müßte experimentell geprüft werden, ob unter den so definierten Bedingungen auch die Anwendung von Gleichungen für ein "mutual depletion system" möglich ist, d.h., ob Metyrapon die Funktion des postulier-

ten Komplexes (Hexobarbital · Cytochrom P-450) · (NADPH · NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase) nichtkompetitiv hemmt.

Überlegungen zur H_2O_2 -Bildung sind nicht nur unter enzymkinetischen Gesichtspunkten interessant. H_2O_2 und andere reduzierte Sauerstoff-Spezies werden auch in der Zelle aus verschiedenen Quellen gebildet. Durch Abspaltung eines $OH^\bullet$ kann es zur Einleitung der Lipidperoxidation und zu DNA-Schäden kommen. Mehrere Enzymsysteme, wie die Katalase in Peroxisomen und die Glutathion-Peroxidase im Zytosol, sorgen unter normalen Bedingungen für den Abbau von H_2O_2 . Liegen in diesen Entgiftungsmechanismen Störungen vor, könnte die Bildung von Wasserstoffperoxid über Cytochrom P-450 auch in vivo wichtig werden (53, 96).

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bildung von Wasserstoffperoxid am Cytochrom P-450 unter der Einwirkung von Metyrapon wurde in Lebermikrosomen von Ratten und Meerschweinchen gemessen. Es wurde sowohl der Einfluß auf die Substrat-unabhängige als auch auf die durch Hexobarbital stimulierte H_2O_2 -Bildung untersucht, und zwar an unbehandelten und an Phenobarbital-behandelten Tieren. Dabei sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Hemmung der Oxidase-Aktivität und der Reduktion der Typ-I-Bindungsspektren von Hexobarbital durch Metyrapon aufgezeigt werden. Metyrapon bot sich als selektiver Hemmstoff einer Cytochrom-P-450-Spezies als Hilfsmittel an. Die Messung des entstandenen H_2O_2 erfolgte indirekt über Formaldehyd, zu dem Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Methanol durch Katalase umgesetzt wird.

Auf die Substrat-unabhängige H_2O_2 -Bildung hatte Metyrapon beim Meerschweinchen keine oder eine nur schwache Wirkung. Bei der Ratte wurde die Substrat-unabhängige Wasserstoffperoxidbildung durch 10^{-4} M Metyrapon auf 60 - 80 % reduziert.

Die Hexobarbital-stimulierte H_2O_2 -Bildung wurde bei beiden Tierspezies durch Metyrapon gehemmt. Kontroll-Meerschweinchen waren empfindlicher für Metyrapon als phenobarbitalbehandelte Tiere. Die I_{50} -Werte lagen bei 10^{-5} bis 10^{-6} M. Im Gegensatz dazu ließ sich die Substrat-stimulierte H_2O_2 -Bildung bei nicht-behandelten Ratten mit Metyrapon nicht hemmen. Phenobarbitalbehandelte Tiere zeigten I_{50} -Werte zwischen 10^{-5} und 10^{-6} M.

Bei beiden Tierarten folgte die Hemmung der H_2O_2 -Bildung einer gemischten kompetitiven/nicht-kompetitiven Kinetik. Sie zeigte eine Mehrphasigkeit mit hoher Metyraponempfindlichkeit im initialen Teil (Konzentrationen $< 10^{-6}$ M). Die ursprünglich geplante Berechnung der katalytisch aktiven Zentren und ihres Turnover mit Hilfe der enzymkinetischen

Gleichungen eines "mutual depletion system" war nicht möglich, da hierfür eine reine nicht-kompetitive Kinetik Voraussetzung ist.

Die bei der Reduktion der Bindungsspektren von Hexobarbital und Cytochrom P-450 durch Metyrapon ermittelten I_{50} -Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Werte für die Hexobarbital-stimulierte H_2O_2 -Bildung. Wie in entsprechenden Versuchen für die Wasserstoffperoxidbildung war eine Reduktion des Bindungsspektrums auf 50 % mit den verwendeten Hemmstoffkonzentrationen bei Kontroll-Ratten nicht möglich.

Insgesamt scheint der Einfluß von Metyrapon auf die Bindung von Hexobarbital stärker zu sein als auf die Substrat-induzierte H_2O_2 -Bildung. Die Ähnlichkeit zwischen den Kinetiken beider Reaktionen macht aber einen Zusammenhang zwischen Hexobarbitalbindung und Wasserstoffperoxidbildung wahrscheinlich.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alvares, A.P., Schilling, G.R., Kuntzman, R. (1968): Differences in the kinetics of benzpyrene hydroxylation by hepatic drug-metabolizing enzymes from phenobarbital- and 3-methylchol-anthrene-treated rats.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 588 - 593
- 2) Andreae, W.A. (1958): A sensitive method for the estimation of hydrogen peroxide in biological materials.
Nature 175, 859 - 860
- 3) Baron, J., Hildebrandt, A.G., Peterson, J.A., Estabrook, R.W. (1973): The role of oxygenated cytochrome P-450 and of cytochrome b₅ in hepatic microsomal drug oxidations.
Drug Metab. Dispos. 1, 129 - 138
- 4) Blake, R.C., Coon, M.J. (1980): On the mechanism of action of cytochrome P-450: Spectral intermediates in the reaction of P-450_{LM2} with peroxy compounds.
J. Biol. Chem. 255, 4100 - 4111
- 5) Blake, R.C., Coon, M.J. (1981): On the mechanism of action of cytochrome P-450: Role of peroxy spectral intermediates in substrate hydroxylation.
J. Biol. Chem. 256, 5755 - 5763
- 6) Boyd, G.S. (1972): Biological hydroxylation reactions.
In: Biological Hydroxylation Mechanism,
Ed: G.S. Boyd, R.M.S. Smellie, Academic Press,
London and New York, 1 - 9
- 7) Conney, A.H., Burns, J.J. (1963): Induced synthesis of oxidative enzymes in liver microsomes by polycyclic hydrocarbons and drugs.
Adv. Enzym. Reg. 1, 189 - 214
- 8) Coon, M.J., van der Hoeven, T.A., Haugen, D.A., Guengerich, F.P., Vermilion, J.L., Ballou, D.P. (1975): Biochemical characterization of highly purified cytochrome P-450 and other components of the mixed function oxidase system of liver microsomal membranes.
In: Advances in Experimental Medicine and Biology 58: Cytochromes P-450 and b₅- Structure, Function, and Interactions.

Ed.: D.Y. Cooper, O. Rosenthal, R. Snyder,
C. Witmer, Plenum Press, New York and London,
25 - 45

- 9) Coon, M.J., Nordblom, G.D., White, R.E., Haugen, D.A. (1975): Purified liver microsomal cytochrome P-450: Catalytic mechanism and characterization of multiple forms.
Biochem. Soc. Trans. 3, 813 - 817
- 10) Coon, M.J., Ballou, D.P., Haugen, D.A., Krezoski, S.O., Nordblom, G.D., White, R.E. (1977): Purification of membrane-bound oxygenases: Isolation of two electrophoretically homogenous forms of liver microsomal cytochrome P-450.
In: Microsomes and Drug Oxidations
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 82 - 94
- 11) Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., Estabrook, R.W. (1965): Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase system.
Science 147, 400 - 402
- 12) Cooper, D.Y., Schleyer, H., Thomas, J.H., Vars, H.M., Rosenthal, O. (1975): Comparison of the induction course, biophysical chemical interactions and photochemical action spectra of phenobarbital and 3-methylcholanthrene induced hepatic microsomal P-450.
In: Advances in Experimental Medicine and Biology 58: Cytochromes P-450 and b₅ - Structure, Function, and Interactions.
Ed: D.Y. Cooper, O. Rosenthal, R. Snyder, C. Witmer
Plenum Press, New York and London, 81 - 102
- 13) Cooper, J.R., Brodie, B.B. (1955): The enzymatic metabolism of hexobarbital (Evipal).
J. Pharmacol. Exper. Therap. 114, 409 - 417
- 14) Degkwitz, E., Ullrich, V., Staudinger, H. (1969): Metabolism and cytochrome P-450 binding spectra of (+)- and (-)-hexobarbital in rat liver microsomes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 547 - 553

- 15) De Graeve, J., Gielen, J.E., Kahl, G.F., Tüttenberg, K.H., Kahl, R., Maume, B. (1979): Formation of two metyrapone N-oxides by rat liver microsomes. Drug Metab. Disp. 7, 166 - 170
- 16) Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. (1963): The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C₂₁-hydroxylase system of the adrenal cortex. Biochem. Zeitschrift 338, 741 - 755
- 17) Estabrook, R.W., Hildebrandt, A.G., Remmer, H., Schenkman, J.B., Rosenthal, O., Cooper, D.Y. (1968): The role of cytochrome P-450 in microsomal mixed function oxidation reactions. In: Biochemie des Sauerstoffs Ed: B. Hess, H.J. Staudinger Springer Verlag, Berlin, 142 - 177
- 18) Estabrook, R.W., Franklin, M.R., Cohen, B., Shigamatzu, A., Hildebrandt, A.G. (1971): Influence of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions on cellular metabolic control. Metabolism 20, 187 - 199
- 19) Estabrook, R.W., Hildebrandt, A.G., Baron, J., Netter, K.J., Leibman, K. (1971): A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 132 - 139
- 20) Estabrook, R.W., Peterson, J., Baron, J., Hildebrandt, A.G. (1972): The spectrophotometric measurement of turbid suspensions of cytochromes associated with drug metabolism. In: Methods in Pharmacology, Vol. II Ed: C.F. Chignell Meredith Corporation, New York, 305 - 350
- 21) Estabrook, R.W., Werringloer, J., Hrycay, E.G., O'Brien, P.J., Rahimtula, A.D., Peterson, J.A. (1975): Cytochrome P-450: An oxygenase, peroxidase and oxidase. Biochem. Soc. Trans. 3, 811 - 813
- 22) Estabrook, R.W., Werringloer, J. (1977): Cytochrome P-450 - Its role in oxygen activation for drug metabolism. In: Drug Metabolism Concepts Ed: D.M. Jerina ACS Symposium Series 44, 1 - 28

- 23) Estabrook, R.W., Werringloer, J. (1977): Active oxygen-fact or fancy.
In: Microsomes and Drug Oxidations
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt,
R.W. Estabrook, A.H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 748 - 757
- 24) Estabrook, R.W., Werringloer, J. (1979): Chairman's introductory statement: The microsomal enzyme system responsible for the oxidative metabolism of many drugs.
In: The Induction of Drug Metabolism
Ed: R.W. Estabrook, E. Lindenlaub
Symposia med. Hoechst 14, Schattauer Verlag
Stuttgart and New York, 187 - 199
- 25) Estabrook, R.W., Werringloer, J. (1978): The measurement of difference spectra: Application to the cytochromes of microsomes.
In: Methods in Enzymology LII, C
Ed: S. Fleischer, L. Packer
Academic Press, New York, 212 - 220
- 26) Estabrook, R.W. (1982): Modifiers and the mechanism of cytochrome P-450 function.
In: Microsomes, Drug Oxidations, and Drug Toxicity
Ed: R. Sato, R. Kato,
Japan Scientific Societies Press, Tokyo,
133 - 138
- 27) Garfinkel, D. (1958): Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions.
Arch. Biochem. Biophys. 77, 493 - 509
- 28) Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949): Determination of serum albumin by means of biuret-reaction.
J. Biol. Chem. 177, 751
- 29) Grasdalen, H., Bäckström, D., Eriksson, L.E.G., Ehrenberg, A., Moldéus, P., von Bahr, C., Orrenius, S. (1975): Heterogeneity of cytochrome P-450 in rat liver microsomes: Selective interaction of metyrapone and SKF 525-A with different fractions of microsomal cytochrome P-450.
FEBS Letters 60, 294 - 299

- 30) Guarino, A.M., Gram, T.E., Gigon, D.L., Greene, F.E., Gillette, J.R. (1969): Changes in Michaelis and spectral constants for aniline in hepatic microsomes from phenobarbital treated rats.
Mol. Pharmacol. 5, 131 - 136
- 31) Guengerich, F.P., Dannan, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V., Kaminsky, L.S. (1982): Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: Electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone.
Biochem. 21, 6019 - 6030
- 32) Harada, N., Omura, T. (1981): Selective induction of two different molecular species of cytochrome P-450 by phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
J. Biochem. 89, 237 - 248
- 33) Harvey, H.J., Glazener, L., Johnson, D.B., Butler, C.M., Horning, M.G. (1977): Comparative metabolism of four allylic barbiturates and hexobarbital by the rat and guinea pig.
Drug Metab. Dispos. 5, 527 - 546
- 34) Haugen, D.A., Coon, M.J., Nebert, D.W. (1976): Induction of multiple forms of mouse liver cytochrome P-450.
J. Biol. Chem. 251, 1817 - 1827
- 35) Heinemeyer, G., Hildebrandt, A.G. (1978): Type I substrate binding and oxidase function of microsomal cytochrome P-450.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, R8
- 36) Heinemeyer, G., Hildebrandt, A.G., Roots, I., Lehne, L., Nigam, S. (1979): Demonstration of drug-ethanol interactions by changes in activity of hepatic microsomal oxidase/oxygenase cytochrome P-450 function.
In: Mechanism of Toxic Action on Some Target Organs, Arch. Toxicol., Suppl. 2, Springer Verlag, 491 - 496

- 37) Heinemeyer, G., Hildebrandt, A.G., Roots, I., Nigam, S. (1980): Stoichiometry of mixed function oxidase-dependent hydroxylation of hexobarbital. In: Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis
Ed: M.J. Coon, A.H. Conney, R.W. Estabrook, H.V. Gelboin, J.R. Gillette, P.J. O'Brien
Academic Press, New York, 335 - 338
- 38) Heinemeyer, G., Nigam, S., Hildebrandt, A.G. (1980): Hexobarbital-binding, hydroxylation and hexobarbital-dependent hydrogen peroxide production in hepatic microsomes of guinea pig, rat and rabbit.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 314, 201 - 210
- 39) Hewick, D.S., Fouts, J.R. (1970): Effects of storage on hepatic microsomal cytochromes and substrate-induced difference spectra.
Biochem. Pharmac. 19, 457 - 472
- 40) Hildebrandt, A.G., Estabrook, R.W. (1969): Spectrophotometric studies of cytochrome P-450 of liver microsomes after induction with phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
In: Microsomes and Drug Oxidation
J.R. Gillette, A.H. Conney, G.J. Cosmides, R.W. Estabrook, J.R. Fouts, G.J. Mannering
Academic Press, New York, 331 - 343
- 41) Hildebrandt, A.G., Leibman, K.C., Estabrook, R.W. (1969): Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 477 - 485
- 42) Hildebrandt, A.G. (1972): The binding of metyrapone to cytochrome P-450 and its inhibitory action on microsomal hepatic mixed function oxidation reactions.
In: Biological Hydroxylation Mechanism
Ed: G.S. Boyd, R.M.S. Smellie
Academic Press, London-New York, 79 - 102
- 43) Hildebrandt, A.G., Speck, M., Roots, I. (1973): Possible control of hydrogen peroxide production and degradation in microsomes during mixed function oxidation reaction.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 968 - 975

- 45) Hildebrandt, A.G., Roots, I. (1975): Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formation and breakdown of H_2O_2 during mixed function oxidation reactions in liver microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 171, 385 - 397
- 45) Hildebrandt, A.G., Lehne, L., Roots, I., Tjoe, M. (1977): Alteration of hepatic microsomal mixed function oxygenase dependent H_2O_2 formation due to "uncoupling" and induction as demonstrated in vivo by elimination kinetics of ethanol in guinea pig.
In: Microsomes and Drug Oxidations
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 492 - 499
- 46) Hildebrandt, A.G., Roots, I., Tjoe, M., Heinemeyer, G. (1978): Hydrogen peroxide in hepatic microsomes.
In: Methods in Enzymology LII, Part C
Ed: S. Fleischer, L. Packer
Academic Press, New York, 342 - 350
- 47) Hildebrandt, A.G., Berge, C., Heinemeyer, G., Schleder, E., Roots, I., Abbas-Ali, B., Schmoldt, A. (1982): Studies on the mechanism of stimulation of microsomal H_2O_2 -formation and benzo(a)pyrene hydroxylation by substrates and flavone.
In: Biological Reactive Intermediates II, Part A
Ed: R. Snyder, D.V. Parke, J.J. Kocsis, D.J. Jollow, C.G. Gibson, C.M. Wittmer
Plenum Publishing Corporation, 179 - 198
- 48) Hildebrandt, A.G., Heinemeyer, G., Roots, I. (1982): Stoichiometric cooperation of NADPH and hexobarbital in hepatic microsomes during the catalysis of hydrogen peroxide formation.
Arch. Biochem. Biophys. 216, 455 - 465
- 49) Hogeboom, G.H. (1955): Fractionation of cell components of animal tissues.
In: Methods in Enzymology I
Ed: S.P. Colowick, N.O. Kaplan
Academic Press, New York, 16 - 19
- 50) Imai, Y., Sato, R. (1966): Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 620 - 626
- 51) Jefcoate, C.R.E., Gaylor, J.L. (1969): Ligand interactions with hemoprotein P-450 II. Influence of phenobarbital and methylcholanthrene. Induction processes on P-450 spectra.
Biochem. 8, 3464 - 3472

- 52) Jeffery, E., Mannering, G.J. (1974): Discrepancy in the measurement of reduced triphosphopyridine nucleotide oxidized during ethylmorphine N-demethylation due to the presence of a nucleotide pyrophosphatase.
Mol. Pharmac. 10, 1004 - 1008
- 53) Jones, D.O., Thor, H., Andersson, B., Orrenius, S. (1978): Detoxication reactions in isolated hepatocytes.
J. Biol. Chem. 253, 6031 - 6037
- 54) Kahl, G.F. (1969): Zur Wirkung von Metyrapon auf Elektronentransportvorgänge in der Leberzelle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 264, 251
- 55) Kahl, G.F., Netter, K.J. (1970): The effect of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxidation.
Biochem. Pharmac. 19, 27 - 34
- 56) Kahl, R., Buecker, M., Netter, K.J. (1977): Sex differences in the pattern of cytochromes P-450 in rat liver microsomes.
In: Microsomes and Drug-Oxidations
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A. H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 177 - 184
- 57) Kröber, F., Lange, G., Mathes, S., Mor, G. (1970): Qualitative Änderungen in Lebermikrosomen Phenobarbital-behandelter Kaninchen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 267, 307 - 326
- 58) Kuthan, H., Ullrich, V. (1982): Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrom P-450 monooxygenase system.
Eur. J. Biochem. 126, 583 - 588
- 59) Leibman, K.C. (1969): Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations.
Mol. Pharmac. 5, 1 - 9
- 60) Leibman, K.C., Ortiz, E. (1973): Metyrapone and other modifiers of microsomal drug metabolism.
Drug Metab. Dispos. 1, 184 - 190
- 61) Levin, W., Lu, A.Y.H., Ryan, D., West, S., Kuntzman, R., Conney, A.H. (1975): Partial purification and separation of multiple forms of cytochrome P-450 and cytochrome P-448 from rat liver microsomes.
In: Advances in Experimental Medicine and

Biology 58: Cytochromes P-450 and b₅-Structure, Function, and Interactions.

Ed: D.Y. Cooper, O. Rosenthal, R. Snyder, C. Witmer

Plenum Press, New York and London, 1 - 24

- 62) Levin, W. (1977): Purification of liver microsomal cytochrome P-450: Hopes and promises.
In: Microsomes and Drug-Oxidations.
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 735 - 747
- 63) Liddle, G.W., Island, D., Lance, E.M., Harris, A.P. (1958): Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 β -hydroxylation.
J. Clin. Endocrin. Metab. 18, 906 - 912
- 64) Lipscomb, J.D., Gunsalus, I.C. (1973): Structural aspects of the active site of cytochrome P-450_{cam}.
Drug Metab. Dispos. 1, 1 - 5
- 65) Lu, A.Y.H., Coon, M.J. (1968): Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes.
J. Biol. Chem. 243, 1331 - 1332
- 66) Lu, A.Y.H., Junk, K.W., Coon, M.J. (1969): Resolution of the cytochrome P-450-containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components.
J. Biol. Chem. 244, 3714 - 3721
- 67) Luu-The, V., Cumps, J., Dumont, P. (1980): Metyrapone-reduced cytochrome P-450 complex: A specific method for the determination of the phenobarbital inducible form of rat microsomal cytochrome P-450.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 93, 776 - 781
- 68) Mason, H.S. (1957): Mechanism of oxygen metabolism.
Adv. Enzym. 19, 79 - 233
- 69) Mason, H.S., Worth, J.C., Vanneste, M. (1965): Microsomal mixed-function oxidations: The metabolism of xenobiotics.
Fed. Proc. 24, 1172 - 1180

- 70) Mitani, F., Shephard, E.A., Phillips, I.R., Rabin, B.R. (1982): Complex of cytochrome P-450 with metyrapone. A convenient method for the quantitative analysis of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 in rat liver microsomes. FEBS Let. 148, 302 - 306
- 71) Mull, R., Hinkelbein, W., Gertz, J., Flemming, K. (1977): A preliminary comparative study on the influence of cysteamine and metyrapone on mixed-function oxygenase activities in variously pretreated liver microsomes from rats and mice. In: Microsomes and Drug-Oxidations Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney Pergamon Press, Oxford, 354 - 361
- 72) Nash, T. (1953): The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J. 55, 416 - 421
- 73) Netter, K.J., Jenner, S., Kajuschke, K. (1967): Über die Wirkung von Metyrapone auf den mikrosomalen Arzneimittellabbau. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 259, 1 - 16
- 74) Netter, K.J. (1968): Inhibition of oxidative drug metabolism by metyrapone. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1618 - 1619
- 75) Netter, K.J., Kahl, G.F., Magnussen, M.P. (1969): Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 265, 205 - 215
- 76) Noshiro, M., Ullrich, V. (1982): Role of cytochrome b_5 in donating the second electron to oxy-P-450 complex. In: Microsomes, Drug Oxidations, and Drug Toxicity Ed: R. Sato, R. Kato Japan Scientific Societies Press Tokyo, 217 - 218
- 77) Omura, T., Sato, R. (1962): A new cytochrome in liver microsomes. J. Biol. Chem. 237, 1375 - 1376

- 78) Omura, T., Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature.
J. Biol. Chem. 239, 2370 - 2378
- 79) Orrenius, S., Ernster, L. (1964): Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Com. 16, 60 - 65
- 80) Orrenius, S., Wilson, B.J., von Bahr, C., Schenkman, J.B. (1972): On the significance of drug-induced spectral changes in liver microsomes.
In: Biological Hydroxylation Mechanism
Ed: G.S. Boyd, R.M.S. Smellie
Academic Press, 55 - 77
- 81) Quinn, G.P., Axelrod, J., Brodie, B.B. (1958): Species, strain, and sex differences in metabolism of hexobarbitone, amidopyrine, antipyrine, and aniline.
Biochem. Pharmac. 1, 152 - 159
- 82) Rahimtula, A.D., O'Brien, P.J. (1977): The peroxidase nature of cytochrome P-450.
In: Microsomes and Drug Oxidations
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 210 - 217
- 83) Remmer, H., Merker, H.J. (1963): Drug induced changes in the liver endoplasmatic reticulum association with drug metabolizing enzyme.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 142, 1657 - 1658
- 84) Remmer, H., Schenkman, J., Estabrook, R.W. (1966): Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmac. 2, 187 - 190
- 85) Roots, I., Hildebrandt, A.G. (1973): Non-competitive inhibition of mixed function oxidase in rat liver microsomes by metyrapone.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 277, 27 - 38
- 86) Roots, I., Hildebrandt, A.G. (1973): Active centers of microsomal cytochrome P-450 determined with metyrapone by mutual depletion system kinetics.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 277, 39 - 52

- 87) Ryan, D.E., Thomas, P.E., Korzeniowski, D., Levin, W.
(1982): Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene.
J. Biol. Chem. 254, 1365 - 1374
- 88) Sanzari, N.P., Péron, F.G. (1966): Influence of metyrapone on substrate-supported hydroxylation of DOC by rat adrenal mitochondria.
Steroids 8, 929 - 945
- 89) Sasame, H.A., Mitchell, J.R., Thorgeirsson, S., Gillette, J.R. (1973): Relationship between NADH and NADPH oxidation during drug metabolism.
Drug Metab. Disp. 1, 150 - 155
- 90) Schenkman, J.B., Frey, I., Remmer, H., Estabrook, R.W. (1967): Sex differences in drug metabolism by rat liver microsomes.
Mol. Pharmacol. 3, 516 - 525
- 91) Schenkman, J.B., Sato, R. (1968): The relationship between the pH-induced spectral change in ferriprotoheme and the substrate-induced spectral change of the hepatic microsomal mixed function oxidase.
Mol. Pharmacol. 4, 613 - 620
- 92) Schenkman, J.B., Sligar, S.G., Cinti, D.L. (1981): Substrate interaction with cytochrome P-450.
Pharmac. Ther. 12, 43 - 71
- 93) Shoemaker, D.D., Hamrick, M.E. (1974): Stoichiometry of drug metabolism in maturing male rats.
Biochem. Pharmacol. 23, 2325 - 2327
- 94) Shoeman, D.W., Chaplin, M.D., Mannering, G.J. (1969): Induction of drug metabolism: Further evidence for the formation of a new P-450 hemo-protein after treatment of rats with 3-methylcholanthrene.
Mol. Pharmacol. 5, 412 - 419
- 95) Sladek, N.E., Mannering, G.J. (1969): Qualitative differences in the microsomal N-demethylating systems stimulated by polycyclic hydrocarbons and by phenobarbital.
Mol. Pharmacol. 5, 186 - 199

- 96) Smith, M.T., Thor, H., Orrenius, S. (1982): Formation and inactivation of active oxygen species during drug metabolism in isolated hepatocytes.
In: Microsomes, Drug Oxidations, and Drug Toxicity
Ed: R. Sato, R. Kato
Japan Scientific Societies Press Tokyo, 605 - 612
- 97) Staudt, H., Lichtenberger, F., Ullrich, V. (1974): The role of NADH in uncoupled microsomal monooxygenations.
Eur. J. Biochem. 46, 99 - 106
- 98) Stripp, B., Zampaglione, W., Hamrick, M., Gillette, J.R. (1972): An approach measurement of the stoichiometric relationship between hepatic microsomal drug metabolism and the oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.
Mol. Pharmac. 8, 189 - 196
- 99) Strobel, H.W., Lu, A.Y.H., Heidema, J., Coon, M.J. (1970): Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation.
J. Biol. Chem. 245, 4851 - 4854
- 100) Tjoe-Reinhard, M.F. (1979): Der Einfluß von Spezies und Induktion auf die NADPH-abhängige H_2O_2 -Bildung in Lebermikrosomen.
Inauguraldissertation, Medizinische Fachbereiche der Freien Universität Berlin
- 101) Vermeulen, N.P.E., Bakker, B.H., Schultink, J., van der Gen, A., Breimer, D.D. (1979): The epoxide-diol pathway in the metabolism of hexobarbital in rat and man.
Xenobiotica 9, 289 - 299
- 102) Waxman, D.J., Walsh, C. (1982): Phenobarbital-induced rat liver cytochrome P-450 purification and characterization of two closely related isozymic forms.
J. Biol. Chem. 257, 10446 - 10457
- 103) Werringloer, J., Chacos, N., Estabrook, R.W., Roots, I., Hildebrandt, A.G. (1977): Microsomal electron transport reactions: The formation and utilization of hydrogen peroxide as related to alcohol metabolism.
In: Alcohol and Aldehyd Metabolizing Systems,

Vol II

Ed: R.G. Thurman, J.R. Williamson, H.R.

Drott, B. Chance

Academic Press, New York, 351 - 360

- 104) Werringloer, J. (1977): The formation of hydrogen peroxide during hepatic microsomal electron transport reactions.
In: Microsomes and Drug Oxidations
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 261 - 268
- 105) Ullrich, V. (1977): The mechanism of cytochrome P-450 action.
In: Microsomes and Drug Oxidations
Ed: V. Ullrich, I. Roots, A.G. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney
Pergamon Press, Oxford, 192 - 201
- 106) Yu, C., Gunsalus, I.C. (1970): Crystalline cytochrome P-450_{cam}.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 1431 - 1436
- 107) Zuber, M.X., Simpson, E.R., Waterman, M.R. (1984): Regulation of activity and synthesis of adrenocortical cytochrome P-450_{17a}
In: 6th Intern. Sympos. on Microsomes and Drug Oxidations, Brighton, Taylor and Francis, London.

Lebenslauf

Name	Gabriele Laschinski
Geburtsdatum	17. 5. 1955
Geburtsort	Berlin
von 1962 bis 1968	Besuch der 2. Grundschule in Berlin-Kreuzberg
von 1968 bis 1974	Besuch der Leibniz-Oberschule in Berlin-Kreuzberg
1974	Abitur
von 1975 bis 1981	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
1981	Staatsexamen
seit 1982	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

An dieser Stelle möchte ich denjenigen danken, die maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beitragen haben:

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. I. Roots für seine wertvollen Ratschläge bei der Konzeption der Experimente, seine unermüdliche Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion und fruchtbare Kritik bei der Abfassung des Manuskripts,

Herrn Prof. Dr. med. A.G. Hildebrandt für seine verständnisvolle Einweisung in die theoretischen Hintergründe und ermutigende Hilfestellung bei der Versuchsplanung,

Herrn Dr. med. G. Heinemeyer für stete Hilfsbereitschaft und viele praktische Ratschläge, besonders bei der Bewältigung von Anfangsschwierigkeiten,

Frau G. Minarek, Frau G. Gruber und Frau E. Berg für technische Hilfestellung und für ihre Geduld und

Frau M. Bigalke für die liebevolle Gestaltung der Abbildungen.

